



# Fonctions de la phospholipase D et des récepteurs de la prostaglandine PGE2 durant la maturation des ostéoblastes, le processus de la minéralisation physiologique et la calcification cardiovasculaire

Dina Abdallah

## ► To cite this version:

Dina Abdallah. Fonctions de la phospholipase D et des récepteurs de la prostaglandine PGE2 durant la maturation des ostéoblastes, le processus de la minéralisation physiologique et la calcification cardiovasculaire. Biochimie [q-bio.BM]. Université Claude Bernard - Lyon I; École Doctorale des Sciences et de Technologie (Beyrouth), 2014. Français. NNT : 2014LYO10152 . tel-01288474

**HAL Id: tel-01288474**

**<https://theses.hal.science/tel-01288474>**

Submitted on 15 Mar 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## **THESE EN COTUTELLE**

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

L'Université Claude BERNARD Lyon1

Et

L'Université Libanaise

Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie

**Spécialité : Biochimie**

Présentée et soutenue publiquement le 11 Septembre 2014 par

**ABDALLAH Dina**

Fonctions de la **Phospholipase D** et des **Récepteurs de la Prostaglandine PGE2** durant la  
**Maturation des Ostéoblastes, le Processus de la Minéralisation Physiologique et la**  
**Calcification Cardiovasculaire.**

### **Rapporteurs :**

Dr. Luc MALAVAL ( Université Jean Monnet, Saint Etienne, France)

Pr. Joseph CAVERZASIO (Université de Genève, Suisse)

Dr. Nicolas VITALE (Université de Strasbourg, France)

### **Membres du Jury :**

Pr.Raghida ABOU MERHI (PRASE, UL, Liban)

Pr.David MAGNE (ODMB, Lyon1 , France)

Pr. Aida HABIB (AUB , Liban)

Dr. Zouhair ATTIEH (AUST, Liban)

Dr. Saïda MEBAREK (ODMB, Lyon1, France)

Dr. Eva HAMADE (PRASE, UL, Liban)

Pr.René BUCHET (ODMB, Lyon1, France)

Pr. Bassam BADRAN (PRASE, UL, Liban)

Examinateur

Examinateur

Examinateur

Examinateur

Co-directrice

Co-directrice

Directeur de thèse

Directeur de thèse

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

### **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

### **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C.  
VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

### **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et  
Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. C. VITON

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOSNE

## REMERCIEMENTS

*Ce mémoire est le fruit d'un travail de trois ans, réalisé en collaboration entre l'Université Libanaise au sein de la Plateforme de Recherche et d'Analyse Scientifique et Environnement et l'Université Lyon1 au sein du Laboratoire de l'Organisation Dynamique des Membranes Biologiques.*

*Ces trois années de thèse ont été l'occasion de rencontres enrichissantes, tant sur le plan personnel que professionnel. Je remercie toutes les personnes qui ont croisé mon chemin, et qui ont contribué à faire de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*Je tiens à remercier tout d'abord, les rapporteurs : M. Luc MALAVALL, M. Nicolas VITALE et M. Joseph CAVERZASIO pour le temps consacré à la lecture de ma thèse. Ils ont également contribué par leurs nombreuses remarques et suggestions à améliorer la qualité de ce mémoire, et je leur en suis très reconnaissant.*

*Je tiens à exprimer ma très grande reconnaissance à tous les membres du jury, au prof. David MAGNE et au prof. Raghlida ABOU MERHI qui ont accepté de juger ce travail et qui m'ont fait l'honneur de participer au jury.*

*Je remercie M. George NEMOZ et M. George BOIVIN qui ont été les membres du comité de suivi de ma thèse durant deux ans. Je les remercie pour leur soutien, pour les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux et leurs suggestions.*

*Je tiens à remercier mon directeur de thèse M. René BUCHET, directeur du Laboratoire ODMB en France, pour m'avoir guidée et accordée une grande confiance pendant les trois années de thèse. Je le remercie pour son aide et son soutien dès mon arrivée en France. J'ai vraiment eu l'honneur d'avoir un directeur comme lui et Je n'oublierai jamais son aide ainsi que ses qualités humaines et scientifiques. J'adresse ma profonde gratitude à ma co-directrice Mme. Saida MEBAREK pour m'avoir encadrée avec rigueur tout au long de ce travail de thèse. Je la remercie très sincèrement pour la confiance et le soutien scientifique et humain qu'elle m'a apportés depuis mon arrivée dans l'équipe ODMB jusqu'à l'aboutissement de ce travail de thèse.*

*Mes remerciements vont également à mon directeur de thèse au Liban M. Bassam BADRAN, directeur de PRASE, pour m'avoir guidée, encouragée et conseillée. Je garde un très bon souvenir de son enseignement pendant mes études en master II. Il m'a fait découvrir la recherche au laboratoire. J'ai beaucoup apprécié son humanité, sa patience et ses encouragements.*

*Je tiens à remercier Mme Eva HAMADE qui, avec sa générosité et sa patience, a guidé mon travail dans la recherche. Je la remercie car elle a su se rendre disponible dès que j'en avais besoin.*

*Je remercie M. Loic BLUM, directeur de l'ICBMS et du laboratoire GEMBAS à Lyon, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Dans la même équipe, je remercie M. Bastien DOUMECHÉ pour son aide.*

*Je tiens à remercier Mme Madeleine Picq, membre de l'unité 870 INSERM / INRA 1235 de Lyon pour l'accueil dans son laboratoire et M. Christophe SOULAGE pour son aide.*

*Je remercie le gouvernement français qui m'a accordé une bourse ministérielle pendant les trois années de ma thèse.*

*Je tiens aussi à mentionner le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de l'Université Américaine à Beyrouth (AUB). Je remercie M. Asaad ZEIDAN et Mme Aida HABIB pour l'accueil dans leur laboratoire.*

*L'ambiance de travail a été excellente. Ils m'ont permis d'intégrer l'équipe et de travailler librement dans leur laboratoire. Je remercie May MRAD ET Mustafa EL HARIRI pour tout ce qu'ils m'ont transmis durant ma première année de thèse à l'AUB. Je remercie Nadia pour son aide.*

*Mes remerciements vont à Mlle Leyre Brizuela pour sa gentillesse et son ambiance vive au laboratoire ODMB.*

*Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner toute l'équipe du laboratoire ODMB, ses membres permanents et non permanents qui m'ont accompagné durant les trois années : Anne BRIOLAY, Carole Bougault, Laurence Bessueille, mes collègues : Do LE DUY, Ren ZHONGYUAN et Maya FAKHRY et la gestionnaire Mme Michèle BOSCH. Je tiens à remercier l'équipe du PRASE au Liban et tous ses membres.*

*Je remercie mes chers parents, Khodor et Nahla, qui ont toujours été là pour moi, « Vous avez tout sacrifié pour vos enfants n'épargnant ni santé ni efforts. Vous m'avez donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je suis redevable d'une éducation dont je suis fière »*

*Je remercie mes frères, Mohamad, Ahmad et Mahmoud pour leur soutien. Mahmoud, je ne trouve pas les mots pour te remercier de tout ce que tu as fait pour moi et surtout ton soutien et ton aide.*

*Je remercie mes sœurs : Rola et Hiba. Ma chère Hiba, aucun mot n'explique le lien fort qui nous unit, nous sommes et nous serons les deux sœurs qui ne se séparent jamais. Ma sœur Rola, merci pour tes efforts et tes aides.*

*A Mohamad, mon futur proche époux, merci pour tout l'amour que tu m'as démontré durant ces trois années. Tu es adorable toujours présent à mon écoute sans jamais te plaindre.*

*Mes stagiaires : Lorelei, Manon et Célia.*

*L'association ALFEL à Lyon qui m'a permis de participer à des activités et des sorties.*

*Mes amis Libanais, français, Arméniens et tunisiens : Sérine, Vard.....*

# **COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

## **ARTICLES:**

**1-Fatty acid compositions in matrix vesicles and in microvilli from femurs of chicken embryos revealed selective recruitment of fatty acids.**

Dina Abdallah, Eva Hamade, Raghida Abou Merhi, Badran Bassam, René Buchet and Saida Mebarek. Biochemical and Biophysical Research Communication. **446**(4): p. 1161-4, 2014.

**2- Proliferation and differentiation of human adipose derived - mesenchymal stem cells into osteoblastic lineage is passage dependent.**

Jiovanni A Di Battista, Wassim Shebaby, Ozge Kizilay, Eva Hamade, Raghida Abou Merhi, Saida Mebarek, Dina Abdallah, Bassam Badran, Fady Saad, Eddie K Abdalla, Wissam Faour. Inflammation research. **Accepté sous révision**, 2014.

## **PUBLICATION EFFECTUÉE DANS LE CADRE DU CONGRÈS INTERNATIONAL :**

Roles of phospholipase D during physiological and vascular calcifications.

Dina Abdallah , Eva Hamade, Bassam Badran, René Buchet , Saida Mebarek.

Bone Abstracts. (3 PP132), 2014.

## **COMMUNICATION ORALE :**

**Journée Institut de Chimie Biochimie moléculaires et Supramoléculaires ICBMS. Lyon, 2013.**

Effet des phospholipases D durant la différenciation des cellules Saos-2.

ABDALLAH Dina, HAMADE Eva, BADRAN Bassam, MEBAREK Saida, BUCHET René.

## **COMMUNICATIONS AFFICHÉES:**

- **Société française de biochimie et biologie moléculaire SFBBM. Grenoble, 2012.**

Identification of the Role of Phospholipase D in the Physiological and Pathological mineralization.

ABDALLAH Dina, YOUJIL Saida, HAMADE Eva, BUCHET René & BADRAN Bassam.

- **Cellular & Molecular Biology Meeting (CMBM). Liban, 2012.**

Identification of the Role of Phospholipase D in the Physiological and Pathological mineralization.

ABDALLAH Dina, YOUJIL Saida, HAMADE Eva, BUCHET René & BADRAN Bassam.

- **Société Française de Biologie des Tissus Minéralisés SFBTM. Poitiers 2013.**  
**(Présentation orale 5 min pour le poster)**

Rôle de la phospholipase D au cours de la minéralisation induite par les ostéoblastes.

ABDALLAH Dina, HAMADE Eva, BADRAN Bassam, MEBAREK Saida, BUCHET René.

- **Journée de l'Institut multidisciplinaire de Biochimie des Lipides IMBL. Dijon, 2013. (Présentation orale 2 minutes pour le poster)**

Roles of phospholipase D during the mineralization of Saos-2 cells.

ABDALLAH Dina, HAMADE Eva, BADRAN Bassam, MEBAREK Saida, BUCHET René.

- **Forum Doctoral à l'Université Libanaise. Liban, 2013.**

Roles of phospholipase D during the mineralization of Saos-2 cells.

ABDALLAH Dina, HAMADE Eva, BADRAN Bassam, MEBAREK Saida, BUCHET René.

- **Journée de l'Institut de Chimie de Lyon ICL. Lyon, France, 2013.**

Roles of phospholipase D during the mineralization of Saos-2 cells.

ABDALLAH Dina, HAMADE Eva, BADRAN Bassam, MEBAREK Saida, BUCHET René.

- **Conférence internationale de la Société Européenne des Tissus Calcifiés ECTS. Prague, Tchécoslovaquie, 2014.**

Roles of phospholipase D during physiological and vascular calcification.

Dina Abdallah, Eva Hamade, Bassam Badran, René Buchet, Saida Mebarek.

- **Conférence internationale des sciences LAAS. Liban, 2014.**

Involvement of phospholipase D and PGE2 receptors during physiological mineralization.

Dina Abdallah, Eva Hamade, Abou Merhi Raghida, Zeidan Asaad, Bassam Badran, René Buchet, Saida Mebarek.

- **Journée de l'Institut multidisciplinaire de Biochimie des Lipides IMBL. Lyon, 2014.**

Phospholipase D acted during physiological and vascular calcification.

Dina Abdallah, Eva Hamade, Bassam Badran, René Buchet, Saïda Mebarek.



# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....</b>	<b>17</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>20</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>22</b>
<b>CHAPITRE I : LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE .....</b>	<b>24</b>
<b>I.1 Généralités .....</b>	<b>25</b>
<b>I.2 La population cellulaire des tissus osseux .....</b>	<b>26</b>
I.2.1. Les cellules bordantes .....	26
I.2.2. Les ostéoblastes .....	27
I.2.3. Les ostéocytes .....	28
I.2.4. Les ostéoclastes .....	28
<b>I.3. La matrice extracellulaire des tissus osseux .....</b>	<b>28</b>
I.3.1. La fraction minérale .....	29
I.3.2. La fraction organique .....	29
I.3.2.1. Les protéines collagéniques .....	29
I.3.2.2. Les protéines non collagéniques .....	30
<b>I.4. Homéostasie osseuse : Le remodelage osseux .....</b>	<b>32</b>
<b>I.5. Les calcifications pathologiques .....</b>	<b>36</b>
<b>CHAPITRE II : LES PHOSPHOLIPASES D .....</b>	<b>40</b>
<b>II.1. Généralités .....</b>	<b>41</b>
<b>II.2. Localisation tissulaire et subcellulaire de la phospholipase D .....</b>	<b>44</b>
II.2.1. PLD1 et sa localisation subcellulaire .....	45
II.2.2. PLD2 et sa localisation subcellulaire .....	46
<b>II.3. Structure de la phospholipase D .....</b>	<b>46</b>
<b>II.4. Régulation des phospholipases D .....</b>	<b>47</b>
II.4.1. Régulation par les protéines G .....	47
II.4.1.1. Famille des protéines Rho .....	48
II.4.1.2. Le facteur de ribosylation de l'ADP .....	48
II.4.1.3. Protéine Ral GTPase .....	50
II.4.2. Régulation par les protéines kinases .....	50
II.4.2.1. Par les protéines kinases C .....	50
II.4.2.2. Par les tyrosines kinases .....	50
II.4.3. Régulation par le PIP2 .....	51
<b>II.5. Fonctions cellulaires des phospholipases D .....</b>	<b>51</b>

II.5.1. Endocytose et exocytose .....	51
II.5.2. Remaniement des cytosquelettes d'actine .....	52
II.5.3. Différenciation cellulaire .....	53
II.5.4. Prolifération cellulaire et apoptose .....	53
II.5.5. Trafic vésiculaire .....	54
<b>CHAPITRE III : LA PROSTAGLANDINE PGE2 .....</b>	<b>56</b>
<b>III.1. Généralités .....</b>	<b>57</b>
<b>III.2. Biosynthèse de la PGE2 et sa dégradation .....</b>	<b>57</b>
<b>III.3. Le mode d'action de la PGE2 .....</b>	<b>59</b>
III.3.1. La structure des récepteurs .....	59
III.3.2. Localisation tissulaire et cellulaire des récepteurs EPs .....	59
III.3.3. Voies de signalisation des récepteurs EPs .....	60
<b>III.4. La PGE2 et son action dans la formation et la résorption osseuse .....</b>	<b>61</b>
<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>63</b>
<b>CHAPITRE IV : MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>65</b>
<b>IV.1. Matériels et produits .....</b>	<b>66</b>
<b>IV.2. Culture cellulaire .....</b>	<b>66</b>
IV.2.1. Lignées cellulaires Saos-2 .....	66
IV.2.2. Ostéoblastes primaires .....	67
IV.2.3. Cellules musculaires lisses primaires .....	67
IV.2.4. Modèle ex-vivo : L'aorte .....	68
<b>IV.3. Passage des cellules (Saos-2 et CMLs) .....</b>	<b>68</b>
<b>IV.4. Différenciation des cellules .....</b>	<b>68</b>
<b>IV.5. Traitements .....</b>	<b>68</b>
IV.5.1. Inhibiteurs des PLDs .....	68
IV.5.1.1. Halopemide .....	68
IV.5.1.2. CAY10593 .....	69
IV.5.2. Activateur de protéines G: Guanosine triphosphate gamma S (GTP $\gamma$ S)...	69
<b>IV.6. Marquage par l'alizarine rouge .....</b>	<b>70</b>
<b>IV.7. Dosage de l'activité de phosphatase alcaline tissue non spécifique TNAP..</b>	<b>70</b>
<b>IV.8. Dosage des protéines (méthode BCA Pierce) .....</b>	<b>71</b>
<b>IV.9. Transfection transitoire des cellules Saos-2 par la lipofectamine LTX .....</b>	<b>71</b>
<b>IV.10. Immuno détection Western Blotting .....</b>	<b>72</b>
<b>IV.11. RT-QPCR .....</b>	<b>73</b>

IV.11.1. Extraction des acides ribonucléiques .....	73
IV.11.2. Transcription inverse .....	73
IV.11.3. Réaction de polymérisation en chaine quantitative QPCR .....	73
<b>IV.12. Détection par fluorescence du cytosquelette d'actine .....</b>	<b>74</b>
<b>IV.13. Dosage de l'activité totale des phospholipases D .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.14. Immunoprécipitation (Kit PureProteome™ sur billes magnétiques .....</b>	<b>75</b>
<b>IV.15. Analyse statistique .....</b>	<b>76</b>
<b>CHAPITRE V : RÉSULTATS .....</b>	<b>77</b>
<b>Partie A : La phospholipase D1 est impliqué dans le processus de la</b>	
<b>minéralisation physiologique .....</b>	<b>78</b>
<b>V.A.1. Caractérisation de la lignée humaine Saos-2, mimant les ostéoblastes, et</b>	
<b>des ostéoblastes primaires issus de calvaria de souriceaux .....</b>	<b>78</b>
<b>V.A.1.1. Dosage des minéraux par coloration à l'alizarine rouge .....</b>	<b>78</b>
<b>V.A.1.2. Dosage de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline tissu non</b>	
<b>spécifique .....</b>	<b>80</b>
<b>V.A.2 Le milieu ostéogénique induit une surexpression significative de la</b>	
<b>PLD1 au jour 5 de stimulation dans les cellules Saos-2 .....</b>	<b>81</b>
<b>V.A.2.1.Expression génomique .....</b>	<b>81</b>
<b>V.A.2.2. Expression protéique .....</b>	<b>82</b>
<b>V.A.3. Le milieu ostéogénique entraîne une augmentation significative de</b>	
<b>l'activité de la phospholipase D dans les cellules Saos-2 et les ostéoblastes</b>	
<b>primaires .....</b>	<b>83</b>
<b>V.A.4. La surexpression de la PLD favorise la minéralisation dans les cellules</b>	
<b>Saos-2 .....</b>	<b>85</b>
<b>V.A.5. L'inhibition de la phospholipase D1 diminue partiellement la</b>	
<b>minéralisation dans les cellules Saos-2 et les ostéoblastes primaires .....</b>	<b>87</b>
<b>V.A.6. Les protéines G interviennent dans le processus de minéralisation</b>	
<b>physiologique .....</b>	<b>89</b>
<b>V.A.7. La PLD1 pourrait intervenir dans le processus de la minéralisation</b>	
<b>physiologique via la voie des protéines G .....</b>	<b>90</b>
<b>V.A.8. La PLD1 est impliquée dans le changement de la morphologie des</b>	
<b>cellules et le réarrangement du cytosquelette d'actine au cours de la</b>	
<b>minéralisation des cellules Saos-2 .....</b>	<b>91</b>
<b>Partie B : La phospholipase D pourrait intervenir dans le processus de la</b>	

<b>calcification cardiovasculaire .....</b>	<b>94</b>
<b>V.B.1. Caractérisation des modèles cellulaires et culture <i>ex vivo</i> .....</b>	<b>94</b>
<b>V.B.1.1. Cellules musculaires lisses primaires .....</b>	<b>94</b>
<b>V.B.1.2. Culture ex vivo de l'aorte de rat .....</b>	<b>97</b>
<b>V.B.2. La phospholipase D est active au cours de la calcification induite dans l'aorte .....</b>	<b>100</b>
<b>Partie C : Rôles des récepteurs de la prostaglandine PGE2 dans le processus de minéralisation selon les conditions physiologiques .....</b>	<b>103</b>
<b>CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>105</b>
<b>CHAPITRE VII : PERSPECTIVES .....</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>113</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>129</b>

# **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

<b>AA</b>	Acide ascorbique
<b>AA*</b>	Acide arachidonique
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AMP<sub>ol</sub></b>	Alcool de 2-amino 2-méthyl-1-propanol
<b>ARF</b>	Facteur d'ADP ribosylation
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>AR-S</b>	Alizarine rouge S
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>AVP</b>	Arginine Vasopressine
<b>AMP<sub>c</sub></b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>BCA</b>	Acide bicinchoninique
<b>BMP</b>	Protéine morphologique de l'os
<b>BSP</b>	Sialoprotéine osseuse
<b>BSA</b>	Albumine de sérum bovin
<b>CCV</b>	Calcification cardiovasculaire
<b>CML</b>	Cellule musculaire lisse
<b>CO</b>	Choline oxydase
<b>Cox</b>	Cyclooxygénase
<b>CPC</b>	Chlorure de Cétypyridinium
<b>CREB</b>	Protéine de liaison en réponse de l'AMP <sub>c</sub> cyclase
<b>DAG</b>	Diacylglycérol
<b>DAPI</b>	Chloroforme, isopropanol et 4.5-diamidino-2 phenylindole
<b>DMEM</b>	Milieu de "Dulbecco's Modified Eagle's "
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>dNTP</b>	Déoxynucléoside triphosphate
<b>DTT</b>	Dithiothréitol
<b>Dlx-5</b>	Distal-less homeobox 5
<b>DMP1</b>	Protéine matricielle de la dentine
<b>EDTA</b>	Acide tétraacétique diamine éthylène
<b>EGF</b>	Facteur de croissance épidermique
<b>FGF2</b>	Facteur de croissance de fibroblaste 2
<b>fMLP</b>	N- formyl-méthionyl- leucyl -phénylalanine
<b>NF-κB</b>	Facteur nucléaire kappa B
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GH</b>	Hormone de croissance
<b>GLA</b>	Garboxyglutamique
<b>GTP<sub>γ</sub>S</b>	Guanosine 5'-O-[gamma-thio] triphosphate
<b>GAPDH</b>	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>HA</b>	Hydroxyapatite
<b>HRP</b>	Peroxydase de raifort
<b>IGF</b>	Facteurs de croissance analogue à l'insuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>IP3</b>	Phosphatidylinositol 1, 4,5 triphosphates
<b>IRC</b>	Insuffisance rénale chronique

<b>IRS-1</b>	Substrat du récepteur de l'insuline
<b>LPA</b>	Acide lysophosphatidique
<b>LTX</b>	Lipofectamine
<b>M-CSF</b>	Facteur stimulant de colonie de monocytes
<b>MEPE</b>	Phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b>mGluR1</b>	Glutamate métabotrope type I
<b>MMP</b>	Métalloprotéinase
<b>mTOR</b>	Cible mammalienne de la rapamycine
<b>Msx-2</b>	Msh homeobox 2
<b>NTP</b>	Nucléotide triphosphate
<b>OCN</b>	Ostéocalcine
<b>OPG</b>	Ostéoprogénitrice
<b>OPN</b>	Ostéopontine
<b>Osx</b>	Ostérix
<b>15-PGDH</b>	15-hydroxy prostaglandine déshydrogénase
<b>PA</b>	Acide phosphatidique
<b>PBS</b>	Solution tampon de phosphate
<b>PChol</b>	Phosphocholine
<b>PDGF</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
<b>PEA</b>	Phosphoéthanolamine
<b>PEt</b>	Phosphatidyléthanol
<b>PG</b>	Prostaglandine
<b>PGI2</b>	Prostacycline
<b>PH</b>	Domaine pleckstrine
<b>Pi</b>	Phosphate inorganique
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
<b>PIP5 kinase</b>	Phosphatidylinositol 5-kinase
<b>PK</b>	Protéines kinases
<b>PLA</b>	Phospholipase A
<b>PLB</b>	Phospholipase B
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PLD</b>	Phospholipase D
<b>PMA</b>	12-myristate 13-acétate
<b>pNPP</b>	P-Nitrophényl Phosphate
<b>PPi</b>	pyrophosphate
<b>PTH</b>	Hormone parathyroïdienne
<b>PX</b>	Domaine Phox
<b>RANKL</b>	Ligand activateur du récepteur NF-κB
<b>RCPG</b>	Récepteurs couplés aux protéines G
<b>RPLP0</b>	phosphoprotéine ribosomale de la grande sous-unité P0
<b>RT</b>	réverse transcriptase
<b>SDS</b>	Sulfate Dodécyl de Sodium
<b>SMase</b>	Sphingomyélinase



<b>SVF</b>	Sérum de fœtus de veau
<b>TBS-T</b>	Tampon Tris salin Tween20
<b>TGFβ</b>	Facteur de croissance transformant β
<b>TNAP</b>	Phosphatase alcaline de tissu non spécifique
<b>TxA2</b>	Thromboxane
<b>VM</b>	Vésicule matricielle
<b>βArr</b>	β-arrestine
<b>β-GP</b>	β-Glycérophosphate

# **LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX**

<b>Figure 1 :</b> Les cellules osseuses : Ostéoclastes, ostéoblastes, cellules bordantes et ostéocytes .....	26
<b>Figure 2:</b> Origine et différenciation des ostéoblastes .....	27
<b>Figure 3:</b> Représentation schématique de la formation d'une fibrille de collagène.....	29
<b>Figure 4 :</b> Schéma représentatif de la fibronectine humaine dimérisée .....	30
<b>Figure 5:</b> Fonctions de TNAP et PC-1 dans la modulation de la concentration de PPI dans la MEC .....	31
<b>Figure 6 :</b> Observation microscopique : (A et B) : Visualisation des ostéons sous lumière polarisée dans l'os lamellaire compact et l'os trabéculaire respectivement.....	33
<b>Figure 7 :</b> Résorption et formation osseuse .....	34
<b>Figure 8:</b> Structure de la paroi artérielle .....	37
<b>Figure 9 :</b> Structure du glycérophospholipide et le site d'action des phospholipases .....	41
<b>Figure 10:</b> Implication des phospholipases dans les étapes initiales du processus de la minéralisation .....	42
<b>Figure 11 :</b> Réactions d'hydrolyse et de transphosphatidylation de la PLD .....	44
<b>Figure 12 :</b> Topologie et localisation des domaines des deux isoformes mammaliennes de la phospholipase D. ....	47
<b>Figure 13 :</b> Modes de régulation de la PLD1 et les fonctions cellulaires associées.....	55
<b>Figure 14 :</b> Biosynthèse de la PGE2.....	58
<b>Figure15 :</b> Voies de signalisation des différents récepteurs de la PGE2.....	60
<b>Figure 16 :</b> Structure chimique de l'halopemide .....	69
<b>Figure 17 :</b> Structure chimique de CAY10593 .....	69
<b>Figure 18 :</b> Structure chimique de GTP $\gamma$ S .....	70
<b>Figure 19:</b> Observation microscopique et quantification des minéraux dans les cellules Saos-2 (A et B) et les ostéoblastes primaires(C et D) stimulées par AA et $\beta$ -GP au cours du temps..	79
<b>Figure 20 :</b> Mesure de l'activité spécifique de TNAP dans les cellules Saos-2(A) et les ostéoblastes primaires(B) .....	80
<b>Figure 21 :</b> Expression génomique des isoformes de la PLD .....	82
<b>Figure 22:</b> Expression protéique de la PLD1 (A) et la PLD2 (B) au cours de la différenciation des cellules Saos-2. ....	83
<b>Figure 23:</b> Mesure de l'activité de la PLD au cours du temps dans les cellules Saos-2 en présence ou non de l'AA et $\beta$ GP(A) et les ostéoblastes primaires en présence uniquement de l'AA et $\beta$ GP (B). ....	84
<b>Figure 24A:</b> Expression des protéines de fusion PLD-GFP dans les cellules Saos-2.....	85

<b>Figure 24B:</b> Quantification des minéraux produits dans les cellules Saos-2 transfectées et stimulées pendant une semaine .....	86
<b>Figure 24C:</b> Mesure de l'activité de TNAP dans les cellules Saos-2 transfectées et stimulées jusqu'au jour 8.....	87
<b>Figure 25 :</b> Quantification des minéraux à l'aide de la coloration AR-S (A et B) et mesure de l'activité de TNAP(C et D) dans les cellules stimulées en présence ou non d'halopemide ou de CAY10593 pendant 7 jours pour les Saos-2 (A et C) et pendant 5 jours pour les ostéoblastes primaires après ajout du $\beta$ -GP (B et D) aux concentrations 0.6 $\mu$ M et 0.8 $\mu$ M .....	88
<b>Figure 26 :</b> Effet du traitement avec GTP $\gamma$ S dans les cellules Saos-2 (A et C) et les ostéoblastes primaires (B et D) stimulées sur l'AR-S et la TNAP .....	90
<b>Figure 27:</b> Effet de l'inhibiteur CAY10593 sur la minéralisation en présence de GTP $\gamma$ S ....	91
<b>Figure 28 :</b> Morphologie des cellules et réorganisation des cytosquelettes d'actine au cours de la minéralisation .....	93
<b>Figure 29A :</b> Observation microscopique des CMLs au cours du temps avant et après la coloration par AR-S .....	96
<b>Figure 29B :</b> Quantification des minéraux dans les cellules CMLs après traitement avec 50 $\mu$ g.ml <sup>-1</sup> AA et 5mM Pi pendant plusieurs jours .....	96
<b>Figure 29C :</b> Effet du milieu ostéogénique sur la transdifférenciation des CMLs .....	97
<b>Figure 30A :</b> Marquage par AR-S des aortes de rat après six jours .....	98
<b>Figure 30B:</b> Mesure de l'activité de TNAP dans l'aorte pendant 6 jours.....	99
<b>Figures 30C et D :</b> Expression de l'ARNm de l'OPN et de RUNX2 par QPCR dans l'aorte de rat.....	99
<b>Figure 31 :</b> Effet de l'halopemide sur l'activité de TNAP dans l'aorte .....	100
<b>Figure 32:</b> Expression de l'ARNm codant pour l'OPN dans l'aorte par QPCR.....	101
<b>Figure 33 :</b> Mesure de l'activité de la PLD dans l'aorte. ....	102
<b>Figure 34 :</b> Expression de l'ARNm des récepteurs de la prostaglandine PGE2 lors de la maturation des cellules Saos-2 .....	104
<b>Figure 35:</b> Action possible de la PLD1 dans la minéralisation physiologique .....	108
<b>Tableau 1:</b> Les facteurs stimulateurs et inhibiteurs impliqués dans le processus de CCV .....	39
<b>Tableau 2 :</b> Amorces permettant l'amplification des gènes spécifiques.....	74

# RÉSUMÉ

## **Fonctions de la phospholipase D et des récepteurs de la prostaglandine PGE2 durant la maturation des ostéoblastes, le processus de la minéralisation physiologique et la calcification cardiovasculaire.**

Le métabolisme lipidique affecte la maturation et la différenciation des cellules osseuses. L'objectif de ma thèse est d'approfondir deux aspects du métabolisme lipidique mal connus, soit les actions de la phospholipase D (PLD) et celles des récepteurs de prostaglandine PGE2 pendant la différenciation des cellules. Une lignée humaine, les Saos-2 et les ostéoblastes primaires issus de calvaria de souriceaux ont servi de modèles cellulaires de la minéralisation physiologique. La culture d'aorte *ex vivo* sous des conditions d'hyperphosphatémie a été utilisée pour reproduire la calcification de l'aorte qui est un modèle *ex vivo* de calcification cardiovasculaire (CCV). Nous avons montré que l'expression et l'activité de la PLD augmentent dans les Saos-2 et les ostéoblastes primaires au bout du 5<sup>ème</sup> jour de la différenciation tandis qu'elles s'accroissent au bout du 6<sup>ème</sup> jour de traitement de l'aorte dans un milieu d'hyperphosphatémie. Les inhibiteurs de PLD diminuent l'activité de phosphatase alcaline (TNAP) dans les ostéoblastes et dans l'aorte calcifiée tandis que la surexpression de la PLD1 dans les Saos-2 l'augmente. Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons suivi la variation d'expression des récepteurs de PGE2 au cours de la maturation des Saos-2. L'expression du gène EP3 augmente au stade tardif de la minéralisation tandis que celle d'EP4 diminue. Pour conclure, ces résultats indiquent que l'activité de la PLD en affectant l'activité de la TNAP pourrait moduler finement la minéralisation physiologique et la CCV et que la minéralisation s'accompagne d'un changement d'expression des récepteurs de PGE2, dans les Saos-2.

**Mots clés:** Calcifications cardiovasculaire et physiologique, phospholipase D, récepteurs PGE2, phosphatase alcaline.

**Ce travail s'est fait en collaboration entre le** Laboratoire de l'Organisation Dynamique Des Membranes Biologiques en France et la Plateforme des Recherches et des Analyses en Sciences de l'Environnement au Liban

# ABSTRACT

## **Functions of phospholipase D and PGE2 prostaglandin receptors during the maturation of osteoblasts, physiological mineralization and cardiovascular calcification process.**

Lipid metabolism affects the maturation and the differentiation of bone cells. The aim of my PhD thesis is to explore two unknown sides of lipid metabolism which are the actions of phospholipase D (PLD) and those of prostaglandin PGE2 receptors during cell differentiation. Human lineage, Saos-2 cells and primary osteoblasts from calvaria of mice were used as cellular models of physiological mineralization. The *ex vivo* aorta culture under hyperphosphatemia conditions has been used to reproduce the calcification of the aorta, which is an *ex vivo* model of cardiovascular calcification (CVC). We showed that the expression and the activity of PLD increased in Saos-2 and primary osteoblasts after the fifth day of differentiation while in the aorta under hyperphosphatemia condition, PLD activity increased at the end of the sixth day. PLD inhibitors decreased the activity of alkaline phosphatase (TNAP) in osteoblasts and in calcified aorta while the overexpression of PLD1 in the Saos-2 increased it. In the second part of this work, we monitored the variation of the expression of PGE2 receptors during the maturation of Saos-2 cells. The EP3 gene expression increased in the late stage of the mineralization while that of EP4 decreased. In conclusion, these results indicated that the PLD activity by affecting the activity of TNAP could modulate the physiological mineralization and CVC. We showed that the mineralization is dependent of the change of the expression of PGE2 receptors in Saos-2 cells.

**Keys words:** Physiological and cardiovascular calcifications, phospholipase D, PGE2 receptors and alkaline phosphatase.

**This work was done through collaboration between the laboratories of** « Organisation Dynamique Des Membranes Biologiques » in France and « Plateforme des Recherches Scientifiques Et Environnement » in Lebanon.



# **CHAPITRE I**

## **LA PHYSIOLOGIE OSSEUSE**

## **I.1. Généralités**

Les os qui supportent le squelette, protègent les organes internes, et en conjonction avec les muscles facilitent le mouvement. Ils sont impliqués par l'intermédiaire des cellules souches dans la formation des cellules sanguines (comme les lymphocytes, les monocytes, les neutrophiles, plaquettes...), le métabolisme du calcium et le stockage de minéraux. L'os est formé de cellules et d'une matrice extracellulaire (MEC) collagénique qui est minéralisée. Il se renouvelle grâce à deux types de cellules, à savoir l'ostéoclaste qui dégrade la matrice osseuse et l'ostéoblaste qui la reconstruit. L'activité de ces deux types de cellules doit être coordonnée pour assurer le renouvellement de l'os et le maintien du squelette. Lors d'une anomalie dans le fonctionnement de l'un de ces types de cellules, le déséquilibre ainsi causé peut donner lieu à des conséquences pathologiques [1, 2]. Des progrès récents majeurs dans la compréhension de la biologie de l'os permettent d'envisager des retombées thérapeutiques dans le traitement des pathologies osseuses telles que l'ostéoporose et la polyarthrite rhumatoïde ainsi que dans le traitement des calcifications ectopiques telles que l'arthrose, la calcification vasculaire et la chondrocalcinose [1, 3, 4]. Il existe deux types d'ossification :

### **L'ossification endomembraneuse.**

Ce type d'ossification aboutit à la formation des os plats du crâne et des clavicules. Ce processus débute par la différenciation de cellules mésenchymateuses du tissu conjonctif fibreux en ostéoblastes pour former un point d'ossification au sein de la membrane fibreuse [5]. Les ostéoblastes sont des cellules mononuclées qui ont pour fonction principale la synthèse de la matrice extracellulaire dont le composant majeur est le collagène de type 1. La différenciation plus tardive est caractérisée par la sécrétion d'ostéocalcine (OCN), responsable du contrôle hormonal de la glycémie par les ostéoblastes [6]. Les ostéoblastes commencent à former une matrice organique qui minéralisent en quelques jours puis ils deviennent des ostéocytes [7].

### **L'ossification endochondrale.**

Elle concerne la croissance des os longs et des vertèbres. Elle débute par l'apparition de centres d'ossification primaire dans la partie centrale de la matrice cartilagineuse. Des chondrocytes prolifèrent et se différencient en s'hypertrophiant au niveau de la partie centrale de la membrane cartilagineuse. La gaine osseuse ou « collier osseux » se forme par différenciation des cellules de la partie inférieure du périchondre [8]. Ces deux types d'ossification résultent d'un processus de minéralisation physiologique en formant les cristaux d'hydroxyapatites (HAs) qui s'associent à des fibrilles de collagène. Les vésicules matricielles (VMs) sont des organites extracellulaires formés à partir de la membrane

plasmique des ostéoblastes et des chondrocytes à l'état hypertrophié. Plusieurs centaines de protéines y sont présentes dont la phosphatase alcaline tissue non spécifique (TNAP) qui est un marqueur de la minéralisation [9].

Les ions phosphates s'accumulent dans les VMs avec des ions calciums et constituent le matériel de base nécessaire à la production d'hydroxyapatite. Les VMs initient la nucléation des cristaux d'HA au contact de la membrane. Puis, soit sous l'action des forces mécaniques et/ou soit sous l'action des lipases, les cristaux d'HA percent la membrane des VMs. La croissance des cristaux d'HA continue dans l'espace extravésiculaire [10].

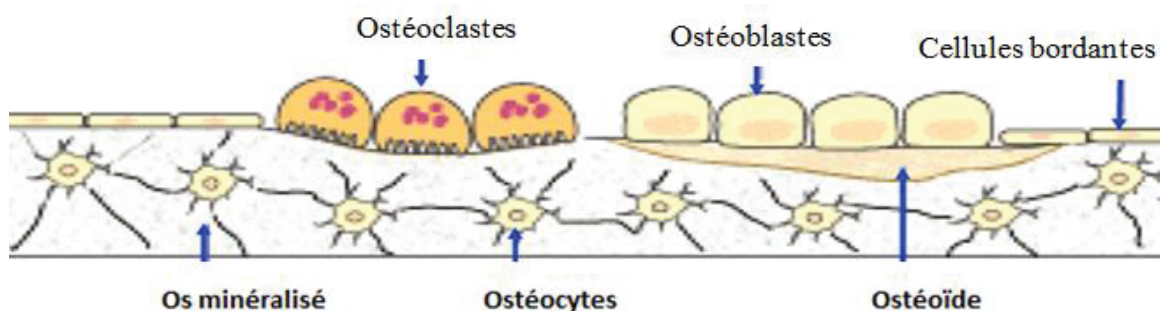
## 1.2. La population cellulaire des tissus osseux

Les cellules osseuses dérivent de deux groupes de cellules souches:

- **Les cellules souches hématopoïétiques** d'où viennent les cellules sanguines et immunitaires dont la lignée monocyte-macrophage est à l'origine des ostéoclastes. Les ostéoclastes résorbent l'os [11].
- **Les cellules souches mésenchymateuses ou stromales** d'où viennent les fibroblastes, les adipocytes, les cellules endothéliales, les ostéoblastes et les chondroblastes. Les ostéoblastes et les chondroblastes contribuent à la formation de l'os [7].

### 1.2.1. Les cellules bordantes

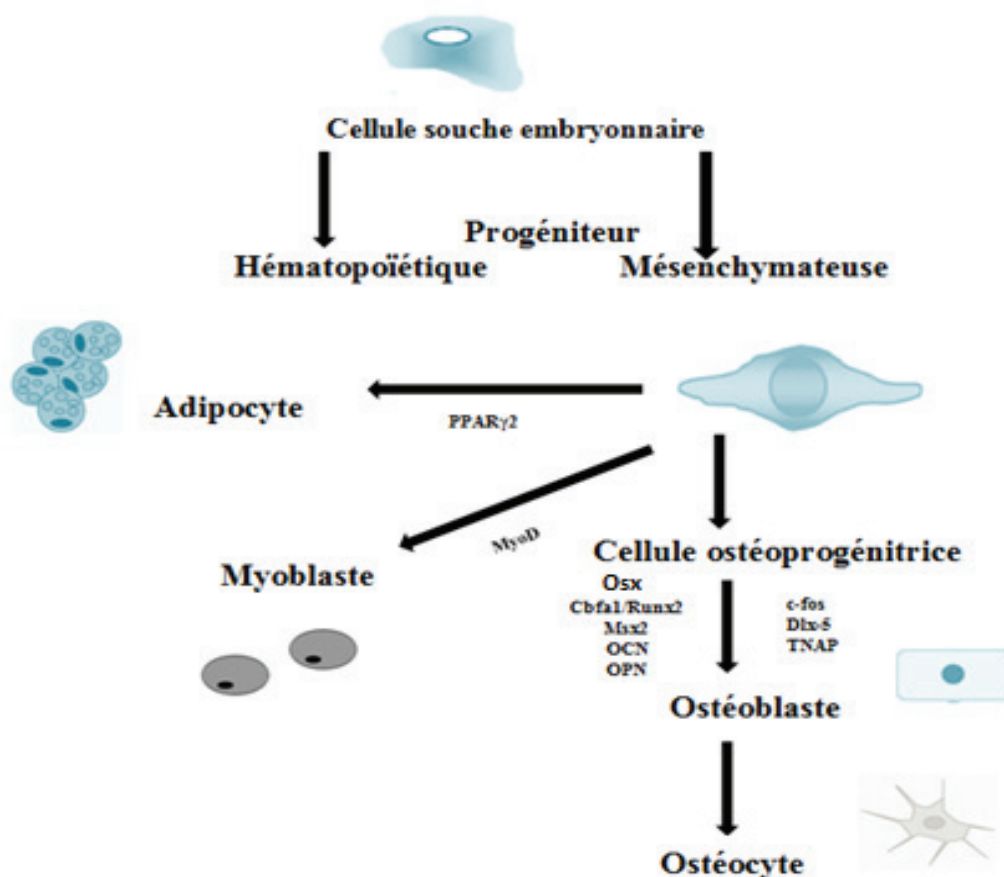
Elles sont situées dans la périphérie de l'os. Il s'agit d'ostéoblastes inactifs de forme plate et allongée mais qui sont capables de reprendre leur activité à tout moment sous l'action de différents stimuli. Elles sont produites par différenciation des ostéoblastes et constituent une source de cellules ostéoblastiques de réserve. (Fig. 1)



**Figure 1** : Les cellules osseuses : Ostéoclastes, ostéoblastes, cellules bordantes et ostéocytes [12]. Figure modifiée d'après Dr. Manuel MARK.

### 1.2.2. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes matures sont des cellules cuboïdales mononuclées, alignées et attachées sur la matrice osseuse et caractérisées par une activité TNAP importante. Ils se trouvent à la surface interne et externe de l'os en croissance et ils sont chargés de synthétiser leur MEC et de la minéraliser. Ces cellules dérivent de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. (Fig. 2) La formation osseuse est principalement dépendante du nombre d'ostéoblastes capables de synthétiser une matrice extracellulaire collagénique et de la minéraliser. Cette différenciation est sous le contrôle de plusieurs facteurs. Tout d'abord, les cellules mésenchymateuses se différencient vers des lignées ostéoblastiques. Puis, à cette étape les cellules se multiplient sous l'effet des facteurs de transcriptions comme Runx2, c-fos et Histone H4. Ensuite, les ostéoblastes deviennent matures et sont capables de synthétiser leur MEC suite à l'expression de la TNAP, du collagène de type I, du facteur transformant de croissance (TGF $\beta$ ) et d'ostéopontine (OPN) [13]. A la phase tardive de différenciation, les cellules deviennent capables de minéraliser leur matrice et expriment les facteurs tardifs comme l'OCN. (Fig. 2)



**Figure 2:** Origine et différenciation des ostéoblastes.

Les cellules hématopoïétiques et mésenchymateuses sont formées à partir de cellules souches embryonnaires. Runx2 est un facteur de transcription exprimé précocement et indispensable à la différenciation de la cellule mésenchymateuse en cellule ostéoprogénitrice [14]. Il participe à l'expression de protéines constituant la matrice, OCN, distal-less homeobox 5 (Dlx-5) et Msh homeobox 2 (Msx-2) et régule positivement l'engagement vers la différenciation des pré-ostéoblastes [15, 16].

Ostérix (osx), est un autre facteur de transcription qui induit l'expression de la TNAP et des propriétés de minéralisation de la matrice [17]. PPAR $\gamma$ 2 est un facteur permettant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes qui sont des cellules multinuclées. MyoD permet leur différenciation en myoblastes.

#### *1.2.3. Les ostéocytes*

Ce sont des cellules fusiformes et aplaties logées dans des cavités creusées de la matrice osseuse minéralisée: ostéoplastes. Elles dérivent de la phase finale de différenciation des ostéoblastes. Elles ont des prolongements qui leur permettent de communiquer avec d'autres ostéocytes [18]. Les ostéocytes, avec ses capacités de synthèse et de résorption limitées, participent au maintien de la matrice osseuse et contribuent à l'homéostasie de la calcémie. (Fig. 1)

#### *1.2.4. Les ostéoclastes*

Les ostéoclastes sont des cellules multinuclées d'origine hématopoïétique. Elles sont responsables de la résorption du tissu osseux, et participent donc à son renouvellement continu. La différenciation en ostéoclastes se fait sous l'intervention de plusieurs facteurs de transcription comme le c-fos et le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B). Le ligand activateur du récepteur NF- $\kappa$ B (RANKL), un ligand qui est sécrété par des ostéoblastes et qui existe aussi en tant que protéine membranaire sur les progéniteurs ostéoblastiques, interagit avec son récepteur RANK qui se trouve sur la membrane des ostéoclastes et des pré-ostéoclastes et induit leur différenciation en ostéoclastes actifs et matures [19].

### **1.3. La matrice extracellulaire des tissus osseux**

La MEC, qui confère à l'os sa dureté et sa résistance, est subdivisée en matrices organique et inorganique. La teneur en eau est très variable en fonction de l'âge et du degré de minéralisation [20].

### *1.3.1. La fraction minérale*

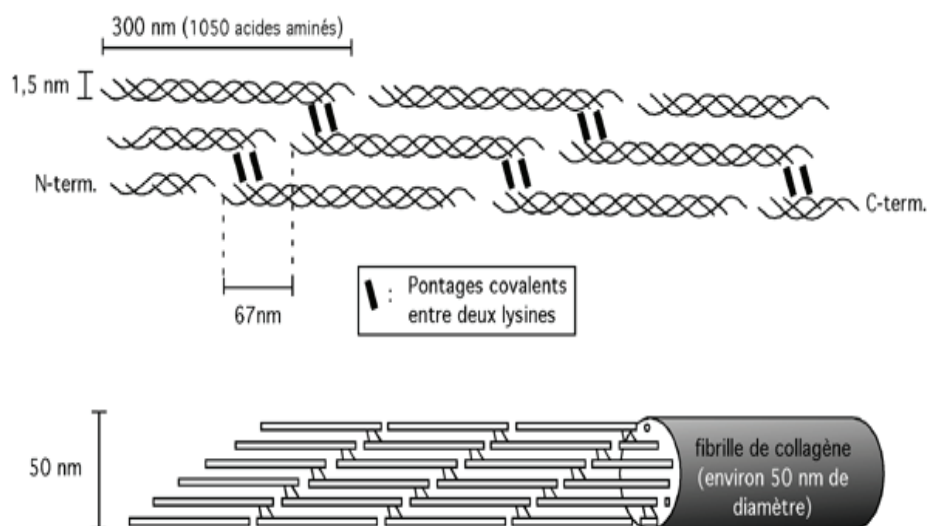
Elle est composée essentiellement des cristaux HAS de structures variables et associés aux fibres de collagène dont l'orientation de ces cristaux est parallèle aux fibres [20].

### *1.3.2. La fraction organique*

Cette fraction est composée de protéines collagéniques et non collagéniques

#### *1.3.2.1. Les protéines collagéniques*

Le collagène est une protéine fibreuse insoluble de la MEC et du tissu conjonctif. C'est la protéine la plus abondante du règne animal. Il est composé de trois chaînes alpha polypeptidiques associées [21]. (Fig.3) Ces chaînes sont reliées par des liaisons hydrogènes entre l'hydroxylysine et l'hydroxyproline et des liaisons covalentes. Une chaîne alpha est constituée de 1050 acides aminés. Chaque type de collagène possède une structure propre et se retrouve dans des organes particuliers. Le collagène est de trois types principaux : celui de type 1, le plus abondant se trouve dans la peau, les tendons et le tissu osseux ; celui de type 2 se trouve dans les cartilages ; celui de type 3 se trouve dans les muscles et les parois des vaisseaux.

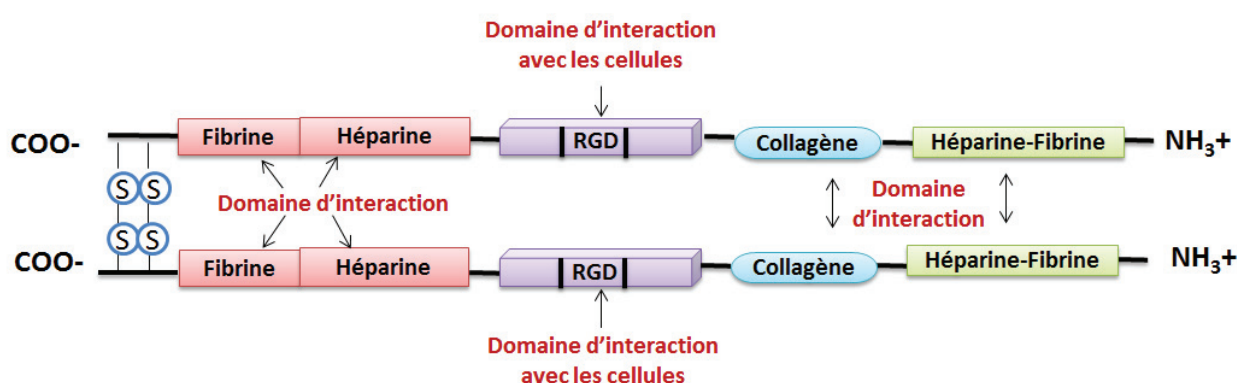


**Figure 3:** Représentation schématique de la formation d'une fibrille de collagène. Elle est formée à partir des chaînes peptidiques, par polymérisations successives entre l'extrémité C-terminale de l'un et N-terminale de l'autre [22]. D'après Benoît Leblanc.

### 1.3.2.2. Les protéines non collagéniques

**Les glycosaminoglycanes (GAGs) et les protéoglycanes:** Les GAGs forment d'importants composants des MECs des tissus conjonctifs et représentent environ 30 % de la matière organique. Ce sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées d'unités disaccharidiques répétitives. A l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAGs sont liés de façon covalente à une protéine pour former les protéoglycanes [23]. Ces molécules, dotées d'un grand pouvoir osmotique, attirent et retiennent l'eau.

**La fibronectine**, est une glycoprotéine dimérisée. Les deux monomères sont reliés par deux ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. La molécule est composée des domaines rigides reliés par des parties flexibles. Les domaines rigides représentent les sites d'interaction avec les autres composantes de la matrice extracellulaire (collagène, protéoglycanes, etc...). La fibronectine peut également lier les intégrines par deux séquences RGD [24-26]. Les molécules de fibronectine s'assemblent pour former des fibrilles à la surface de nombreuses cellules. (Fig.4)



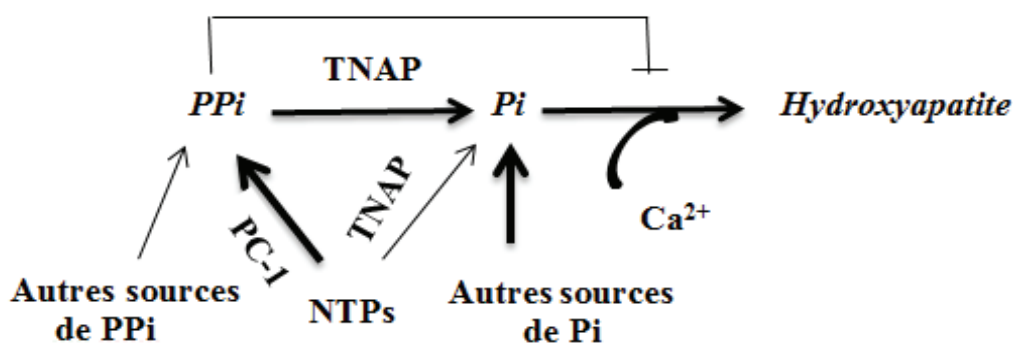
**Figure 4 :** Schéma représentatif de la fibronectine humaine dimérisée [27]. Figure modifiée d'après la référence citée.

**L'ostéopontine (OPN)**, est une protéine d'adhérence du tissu osseux reliant l'HA aux cellules osseuses. Elle appartient à la famille des SIBLING « Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoproteins » incluant la sialoprotéine osseuse (BSP), la phosphoglycoprotéine de la matrice extracellulaire (MEPE) et la protéine matricielle de la dentine DMP1 qui jouent des rôles multiples et distincts dans le développement, le remodelage et la minéralisation de l'os et de la dentine.

**L'ostéocalcine (OCN)**, est un marqueur de la formation osseuse. Elle est formée d'un peptide de 49 acides aminés disposés en une seule chaîne. Elle est exclusivement synthétisée par les ostéoblastes matures. Sa synthèse dépend de la vitamine K pour la carboxylation des trois acides  $\gamma$ -carboxyglutamiques (GLAs) en position 17, 21 et 24 [28, 29]. Ces GLAs confèrent à l'OCN une forte affinité pour l'HA, mais également une structure tertiaire plus ou moins compacte selon la richesse en calcium. La majeure partie de l'OCN est incorporée à l'os. Elle attire et active les ostéoclastes et joue donc un rôle dans le renouvellement osseux [30].

**L'ostéonectine**, est une glycoprotéine synthétisée par les ostéoblastes en concentration élevée dans la MEC où elle se lie fortement au collagène et à l'HA [31].

**La phosphatase alcaline tissue non spécifique (TNAP)** catalyse l'hydrolyse des ions pyrophosphates ( $PP_i$ ) qui sont des inhibiteurs de formation d'HA [32]. (Fig. 5)



**Figure 5:** Fonctions de TNAP et PC-1 dans la modulation de la concentration de  $PP_i$  dans la MEC.  $PP_i$  provient, entre autres, de l'hydrolyse des nucléotides triphosphates extracellulaires (NTPs) par une ecto enzyme PC-1, tandis que la TNAP hydrolyse le  $PP_i$  et également NTPs [32]. Figure modifiée d'après Balcerzak M. et al.

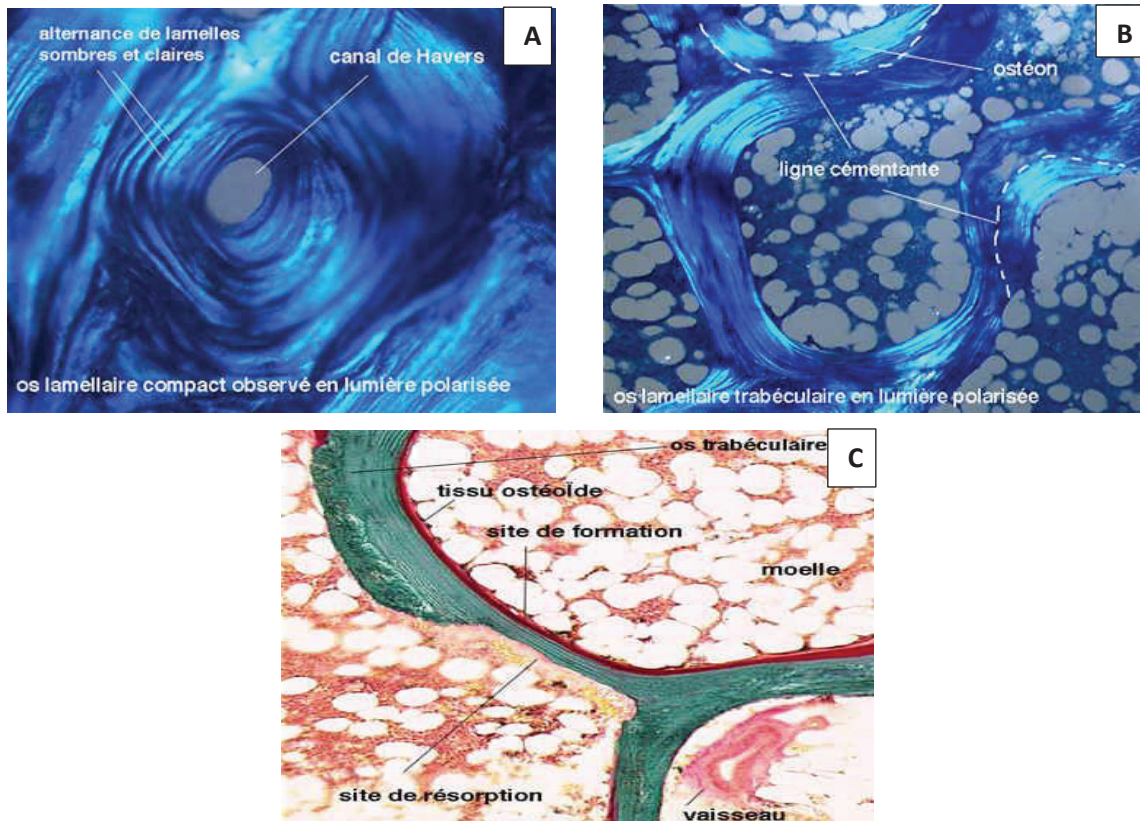
L'ectonucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-1 (PC1) hydrolyse les nucléotides triphosphates (NTPs) en produisant du  $PP_i$ . Le  $PP_i$  est également relargué dans la MEC par des cellules contribuant à augmenter la concentration du  $PP_i$ . Un excès de  $PP_i$  inhibe la formation d'HA. La TNAP, en hydrolysant le  $PP_i$  lève l'inhibition de la formation d'HA tout en produisant du Pi [32]. C'est pour cette raison que l'activité de la TNAP est un marqueur des processus de minéralisation.



*Les facteurs de croissance*, certains ont pu être isolés dans la matrice osseuse, comme le TGF- $\beta$  ou quelques membres de la famille des facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGFs) [33, 34].

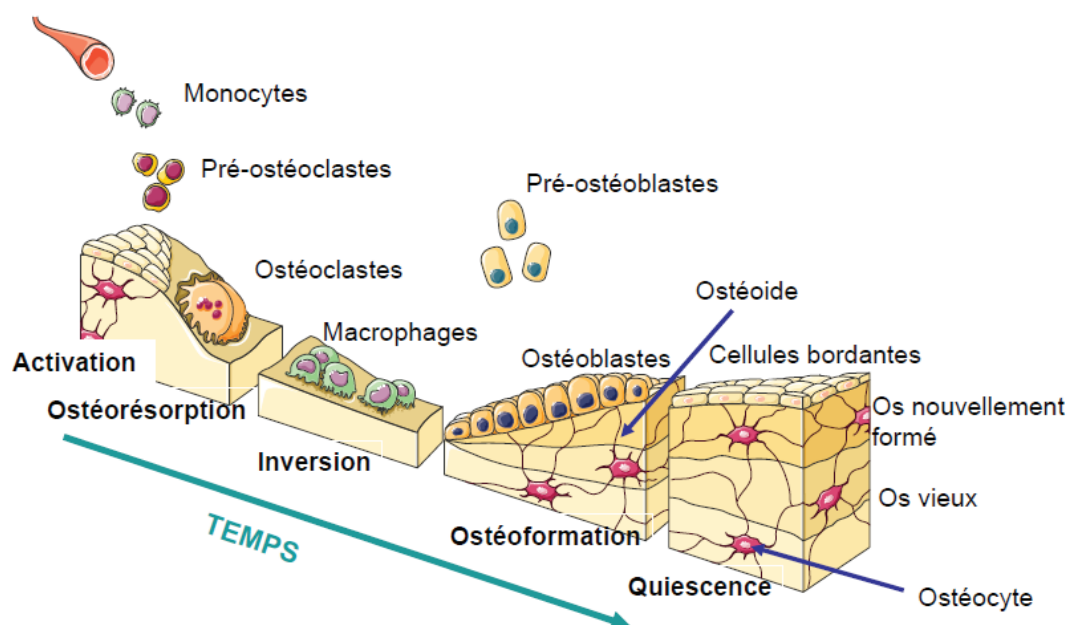
#### **I.4. Homéostasie osseuse : Le remodelage osseux**

Le tissu osseux est en constant renouvellement de l'os compact ou trabéculaire. L'observation du tissu osseux a amené à la conception d'unité fonctionnelle de remodelage qui est formée d'ostéoblastes et d'ostéoclastes dont leur activité métabolique est étroitement couplée dans l'espace et dans le temps [35]. L'unité fonctionnelle de remodelage (résorption puis formation) entraîne la formation d'une unité structurale appelée ostéon. Sous une observation en lumière polarisée, l'ostéon est cylindrique dans l'os compact (Fig.6A) et a l'aspect d'un croissant dans l'os trabéculaire (Fig.6B). La durée de ce cycle de remodelage dure environ 4 mois chez l'adulte, la phase de formation étant plus longue que celle de la résorption. Les unités de remodelage ne sont pas synchrones, ce qui permet d'adapter la quantité et l'architecture de l'os, en fonction de facteurs systémiques (Hormone Parathyroïdienne (PTH), Vitamine D) ou locaux. L'os est ainsi formé de millions d'unités fonctionnelles de remodelage. (Fig.6C)



**Figure 6 :** Observation microscopique : (A et B) : Visualisation des ostéons sous lumière polarisée dans l'os lamellaire compact et l'os trabéculaire respectivement. C : Remodelage osseux sous microscopie optique [36]. Autorisation de reproduire la figure accordée par Mme M .H. Lafage Proust.

Le remodelage osseux comporte quatre phases : (Fig. 7)



**Figure 7 :** Résorption et formation osseuse. Le cycle de remodelage débute par une phase d'activation caractérisée par la différenciation des ostéoclastes qui exercent leur fonction de résorption osseuse. A la suite de cette phase, les ostéoclastes se détachent et meurent par apoptose et les précurseurs des ostéoblastes entament leur processus de différenciation en cellules matures qui synthétisent une nouvelle matrice et comble la lacune de résorption. A la fin de cette étape de formation osseuse, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes, subissent un phénomène d'apoptose ou se laissent inclure dans la matrice en devenant des ostéocytes [12]. Autorisation de reproduire la figure accordée par Dr. Manuel MARK.

### **Phase d'activation**

Les cellules bordantes recouvrent la surface osseuse, ce qui permet d'empêcher l'accès des ostéoclastes à la MEC. Les cellules bordantes se rétractent sous l'action de plusieurs facteurs (PTH, vitamine D3 et prostaglandine PGE2) et libèrent l'accès aux ostéoclastes. La prolifération des précurseurs médullaires des ostéoclastes favorise l'afflux des ostéoclastes sous l'effet de plusieurs molécules comme le facteur stimulant de colonie de monocytes (M-CSF). La différenciation ostéoclastique est principalement sous la dépendance de trois molécules: RANKL, ostéoprotégérine (OPG) et RANK. RANKL, situé dans la membrane plasmique des ostéoblastes, peut se lier à l'OPG, sécrétée par les ostéoblastes ou à RANK, récepteur situé dans la membrane des précurseurs ostéoclastiques. La liaison entre RANKL et RANK stimule la différenciation ostéoclastique [37] tandis que la liaison entre RANKL et OPG l'inhibe.

### ***Phase de résorption***

Les cellules ostéoclastiques différenciées deviennent actives et résorbent l'os ancien et forment une lacune osseuse. Cette phase s'effectue en deux étapes successives : 1) dissolution de la phase minérale par acidification du compartiment de résorption 2) dégradation de la matrice organique sous l'action d'enzymes protéolytiques lysosomales [38-40]. Le domaine apical de la membrane plasmique de l'ostéoclaste formant le toit de la chambre de digestion se différencie en une bordure en brosse au niveau de laquelle se trouve une pompe à protons qui sécrète des ions  $H^+$ . Ces ions dissolvent la phase minérale de la MEC par acidification [41]. Les lysosomes qui se trouvent encore au niveau de la bordure en brosse de la cellule déversent leur contenu enzymatique (hydrolases acides et notamment phosphatases acides, cathepsines, collagénases, métalloprotéinases (MMPs)) afin de digérer les constituants organiques de la MEC osseuse. Il est connu que les hormones comme la PTH et la vitamine D3, ainsi que certaines cytokines (interleukines (IL-1),  $TNF-\alpha$ ) induisent la sécrétion par les ostéoblastes de facteurs moléculaires locaux (M-CSF, IL-6, IL-11, PGE2) [42]. Ces derniers, à l'exception du M-CSF, stimulent en retour l'expression du facteur membranaire RANKL sur l'ostéoblaste [43]. Le facteur RANKL interagit avec son récepteur RANK porté par le précurseur ostéoclastique et déclenche la différenciation cellulaire qui aboutit à l'activation de l'ostéoclaste.

### ***Phase d'inversion ou de réversion***

Les ostéoclastes ayant achevés une lacune meurent par apoptose. Cette phase correspond au remplacement des ostéoclastes par des cellules mononuclées de type macrophagiques qui vont lisser le fond de la lacune.

### ***Phase de formation***

Elle est caractérisée par le recrutement des ostéoblastes au fond de la lacune. (Fig. 7) Les ostéoblastes comblent la lacune en apposant une nouvelle matrice collagénique. Plusieurs hormones, comme les œstrogènes, les androgènes et la vitamine D stimulent la synthèse de la matrice osseuse. De nombreux facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes, stockés dans la matrice osseuse, puis largués sous forme active lors de la résorption, agissent de façon concomitante avec le facteur de croissance de fibroblaste 2 (FGF2),  $TGF\beta$ , facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) (dont la synthèse est stimulée par l'hormone de croissance (GH)) et les protéines de la morphogenèse osseuse (BMPs) [44]. Enfin, les ostéoblastes synthétisent des facteurs de croissance régulant leur propre métabolisme, des

facteurs paracrines qui vont influencer le métabolisme des cellules voisines (IL-1, facteurs stimulant la formation ou l'activité des ostéoclastes) et des enzymes (comme la TNAP qui hydrolyse les PPI). Les ostéoblastes se différencient en ostéocytes et certains facteurs sont inclus dans la matrice ostéoïde et qui seront ultérieurement libérés quand l'os sera résorbé [45, 46].

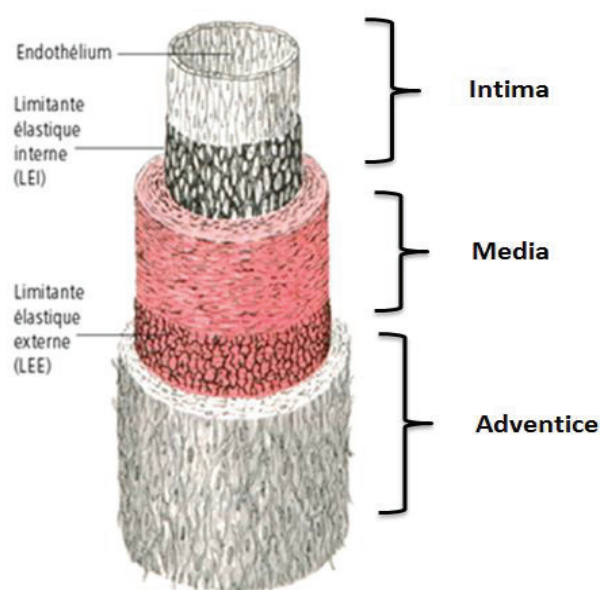
### **I.5. Les calcifications pathologiques**

Les tissus mous selon les conditions physiologiques ne nécessitent normalement aucun apport minéral particulier et ne minéralisent pas. En effet, seulement les dents et les os ont besoin de capter le calcium en grande quantité et de minéraliser. Cependant, selon certaines conditions pathologiques, les tissus mous peuvent se calcifier. Jusqu'à environ une dizaine d'années, les précipitations phosphocalciques dans les tissus mous, sous forme de dépôts amorphes ou cristallins, étaient considérées comme un phénomène passif lié à l'augmentation des concentrations locales de calcium, de phosphate ou des deux [47, 48]. Récemment, plusieurs travaux ont apporté des preuves irréfutables en faveur de l'intervention des enzymes contrôlant l'homéostasie du PPI et de certains mécanismes cellulaires dans les processus de la calcification des tissus mous [49, 50]. D'un point de vue médical, il existe au moins trois familles de calcifications pathologiques. Une première correspond à des concrétions solides formées dans une cavité ou un canal excréteur (calculs rénaux, biliaires, salivaires, vésicaux...). Une deuxième se réfère aux calcifications tissulaires ou ectopiques localisées en dehors des canaux excréteurs (qui peuvent être liées parfois à des pathologies sévères comme les cancers du sein, de la thyroïde, des testicules ou encore de la prostate) [51-53] et enfin à des calcifications vasculaires [54]. Dans certains cas, des calcifications non contrôlées, ayant lieu dans les tissus minéralisés comme dans l'os ou la dent, peuvent aboutir à des calcifications pathologiques suite à une maladie. Parmi les calcifications ectopiques, qui sont initiées par des VMs produites par des cellules [10] qui sont devenues capables de minéraliser, nous pouvons citer :

**L'arthrose (ou ostéoarthrite)** qui est la forme d'arthrite la plus fréquente et survient en raison du vieillissement et de l'usure du cartilage au sein des articulations. Il s'agit de l'inflammation des articulations et de la destruction du cartilage qui peuvent entraîner le frottement des os entre eux et causer des douleurs, des raideurs et des enflures des articulations. La calcification du cartilage pourrait être causée par des VMs secrétées par des chondrocytes à l'état hypertrophié [10]. Alternativement, l'arthrose ne conduit pas toujours à la calcification du cartilage. Dans un premier temps, l'équilibre entre production des protéines matricielles et enzymes de dégradation (MMPs) est maintenu. Parallèlement, le chondrocyte

arthrosique libère des cytokines proinflammatoires, IL-1b, TNF $\alpha$  et monoxyde d'azote (NO) qui stimulent la production des MMPs. Lorsque l'activité d'anabolisme et la prolifération des chondrocytes diminuent, cela peut aboutir à la destruction progressive du cartilage [55]. Les chondrocytes s'épuisent et la synthèse des composants matriciels diminue tandis que la production d'enzymes de dégradation est maintenue. Un déséquilibre s'installe alors au profit du catabolisme induit par la libération de médiateurs inflammatoires qui s'accroît lors de la pathologie de l'arthrose (phospholipase A2, prostaglandines, IL-1b, TNF $\alpha$ ...). Ce déséquilibre implique également la mort par apoptose des chondrocytes sous l'action délétère de certains médiateurs comme l'IL-1b ou le NO [56].

**Les calcifications cardiovasculaires**, une calcification cardiovasculaire (CCV) est un processus pathologique caractérisé par l'épaississement et la perte d'élasticité de la paroi d'artères musculaires dû à une calcification au niveau des couches de la média et / ou de l'intima [57]. (Fig.8)



**Figure 8:** Structure de la paroi artérielle : Les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation. Leur paroi est constituée de trois tuniques qui, de l'intérieur vers l'extérieur, sont : l'intima, la média et l'adventice [58]. Figure modifiée à partir de la référence citée.

Une différence existe entre la calcification de l'intima et celle de la média. La première se fait dans la plaque d'athérosclérose dans l'aorte, les artères coronaires et les artères de gros calibres. Alors que la calcification de la média se fait chez des patients atteints de syndrome métabolique, de diabète et/ou de maladie d'insuffisance rénale chronique (IRC). La CCV est le problème majeur des patients atteints de l'IRC. La fréquence de la CCV augmente



parallèlement avec le dysfonctionnement rénal progressif [59]. La CCV est un processus complexe, impliquant non seulement une simple précipitation de phosphate et de calcium mais aussi des processus à médiation cellulaire, y compris l'apoptose, la différenciation ostéochondrocytaire et la dégradation de l'élastine [60]. L'évolution dans le temps de ces deux étapes *in vivo* reste mal définie. Plusieurs événements ont été décrits et interviennent dans le processus de CCV lors de l'IRC: Les cellules musculaires lisses (CMLs) en apoptose sont considérées comme un facteur important dans l'initiation de calcification vasculaire. En effet, les CMLs dans des plaques d'athérosclérose deviennent plus apoptotiques que celles dans un cas normal [61, 62]. Les corps apoptotiques dérivés à partir de ces cellules, peuvent faciliter la nucléation pour la formation de cristaux de calcium [63, 64]. Alternativement, d'autres types de vésicules telles que les VMs sont impliquées dans la première étape de la minéralisation. Selon les conditions pathologiques, particulièrement lors de l'IRC, les CMLs peuvent se transdifférencier en ostéochondrocytes. Elles ont la caractéristique de former des VMs et des fibrilles de collagène à leur surface. Les changements phénotypiques comme l'expression de l'OCN et de la TNAP ont été observées dans les CMLs différenciées. RUNX2 et Msx2, nécessaires pour la formation de l'os, sont également exprimés dans les CMLs différenciées [65]. Par ailleurs, dans les artères calcifiées d'origine humaine, Sox9 et le collagène de type II qui sont des marqueurs importants pour la différenciation chondrocytaire sont exprimés [66]. Un autre mécanisme qui intervient dans la CCV, est l'élastocalcinose qui est caractérisée par le dépôt des cristaux HAs dans les lamelles d'élastine de l'artère. La dégradation de l'élastine joue un rôle important dans la progression de la CCV, elle est induite par l'élastase, les MMPs et autres protéases. L'élastine dégradée a une forte affinité pour le calcium, facilitant la croissance de l'HA entre les lamelles d'élastine [67]. Des résultats récents suggèrent l'existence d'un remodelage vasculaire, similaire à celui observé dans l'os, qui serait responsable du développement des CCVs. Ces mêmes résultats mettent en avant le rôle des toxines urémiques [68]. En effet, le sérum de patients urémiques induit la différenciation des CMLs en cellules avec un phénotype similaire à celui des ostéoblastes, et parallèlement inhibe la différenciation des monocytes-macrophages en ostéoclastes. Le déséquilibre entre ces deux processus dans la paroi vasculaire, en faveur de la formation de cellules avec un phénotype similaire à celui des ostéoblastes, pourrait être responsable de la genèse et de la pérennisation des calcifications [68]. Cependant, les toxines urémiques, qui contribuent au développement des CCVs, semblent avoir des effets indépendants sur la paroi vasculaire dès le début de l'IRC. Au cours du stade précoce d'IRC, des modifications fonctionnelles (dysfonction endothéliale) plutôt que des altérations structurales contribuent aux anomalies

hémodynamiques aortiques [68]. La toxicité urémique semble être également associée au développement des calcifications au niveau des artères intracrâniennes. La connaissance des mécanismes responsables du développement des CCVs et de leurs conséquences pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitements pharmacologiques susceptibles de les prévenir et/ou de les traiter et donc de diminuer la mortalité et la morbidité cardiovasculaire, non seulement chez les patients en IRC mais aussi dans la population générale [68]. Au niveau des mécanismes moléculaires, plusieurs molécules promotrices et inhibitrices pour la CCV ont été identifiées [69-72]. (Tableau 1)

**Tableau 1:** Les facteurs stimulateurs et inhibiteurs impliqués dans le processus de CCV [57].

<b>Inhibiteurs</b>	<b>Promoteurs</b>
Magnésium	Hypercalcémie
Pyrophosphate (PPi)	Hyperphosphatémie
Ostéopontine (OPN)	Ligand du récepteur nucléaire activateur Kappa B (RANKL)
Protéine matricielle Gla (MGP)	Protéine morphogénétique osseuse 2 (BMP-2)
Ostéoprotégérine (OPG)	
Protéine morphogénétique osseuse 7 (BMP-7)	
Klotho	
FetuinA	

Le gène *klotho* code pour une protéine transmembranaire et il a été identifié chez une souche mutante de souris qui ne l'exprime pas et qui manifeste des désordres multiples comparables à ceux du vieillissement humain comme la diminution de la densité osseuse, l'artériosclérose... *Fetuin A* est une protéine du sang qui est faite dans le foie et sécrétée dans la circulation sanguine.

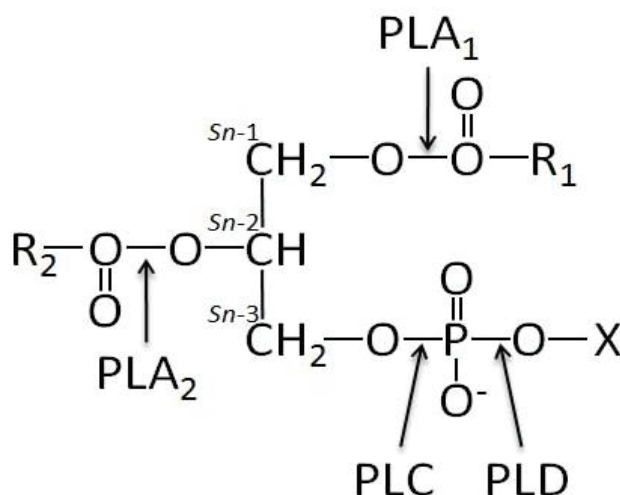


# **CHAPITRE II**

## **LES PHOSPHOLIPASES D**

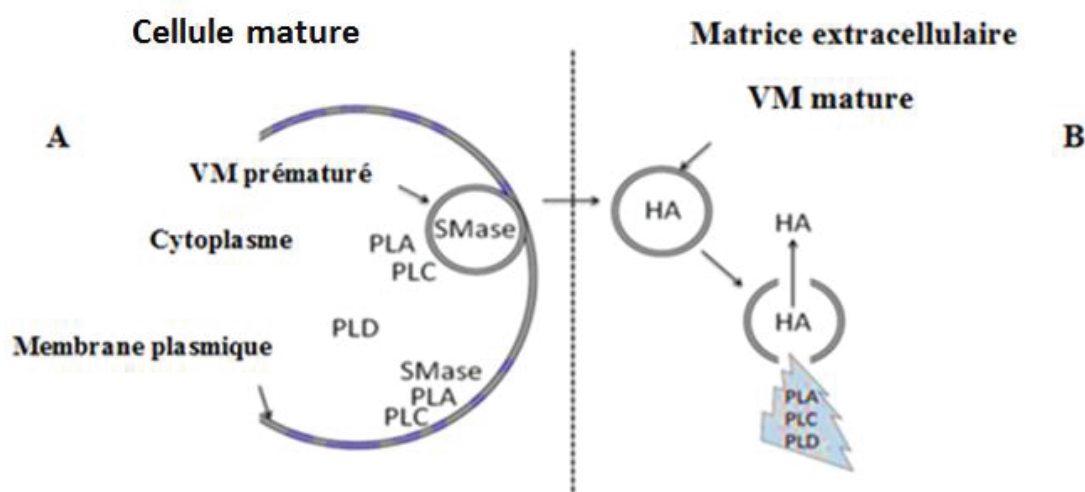
## II.1. Généralités

De nombreux résultats expérimentaux indiquent que les phospholipases pourraient avoir une action au cours des différentes étapes de la minéralisation : 1) au niveau du remodelage de la membrane plasmique et de la formation des VMs (Fig.10) ; 2) au niveau de la formation des cristaux d'HAs; 3) au niveau des réactions inflammatoires 4) au niveau de la maturation et de la différenciation des cellules [73]. Les phospholipases sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides et leurs actions sont spécifiques. La phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) clive la chaîne acyle qui estérifie la fonction alcool primaire du résidu glycérol, libérant un acide gras et un 1-lysophospholipide, la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) clive la chaîne acyle qui estérifie la fonction alcool secondaire du résidu glycérol, libérant un acide gras et un 2-lysophospholipide, la phospholipase B (PLB) possède les deux activités enzymatiques précédentes. PLB clive les chaînes acyles estérifiant les deux hydroxyles libres du glycérol, la phospholipase C (PLC) hydrolyse la liaison ester entre le glycérol et le phosphate, libérant un diglycérade et un phosphate d'alcool. La phospholipase D (PLD) hydrolyse la liaison ester entre la fonction acide du phosphate et l'alcool, libérant un acide phosphatidique (PA) et un alcool. (Fig.9) Leurs produits catalytiques peuvent être impliqués dans la signalisation intracellulaire, dans le remodelage de la membrane, dans l'endocytose ou dans l'exocytose des VMs [73]. En outre, les phospholipides contiennent du phosphate, un précurseur de formation d'HAs. Leurs produits hydrolytiques peuvent servir comme réservoir de phosphate pour maintenir la minéralisation.



**Figure 9 :** Structure du glycérophospholipide et le site d'action des phospholipases. Les flèches indiquent les sites d'action des phospholipases. Les atomes de carbone du squelette du glycérol des glycérophospholipides sont indiqués selon la numérotation stéréochimique (sn-1, sn-2 et sn-3) [73].

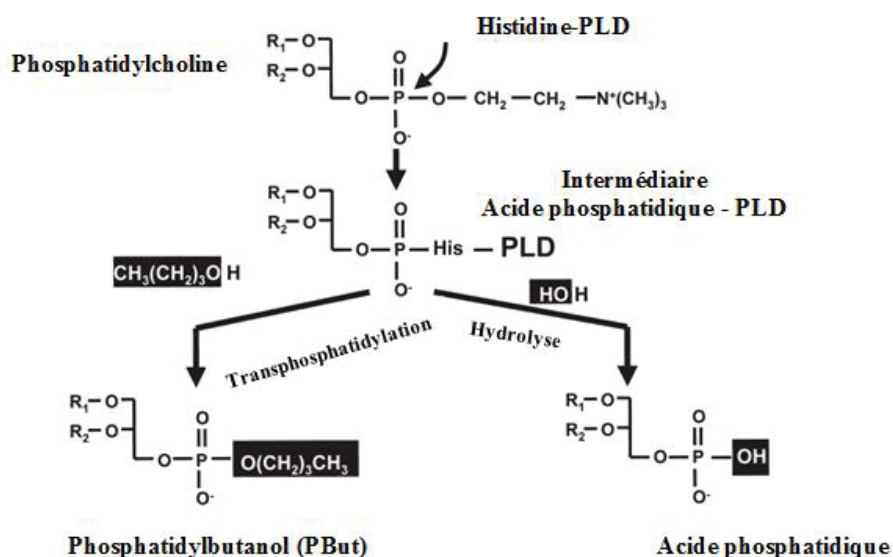
Chaque classe de phospholipases, en fonction de la nature des produits, agit d'une manière distincte. (Fig.10) 1) Le rôle des **PLA1** dans le processus de minéralisation est très peu connu. 2) Les **PLA2** sont à l'origine de la production de l'acide arachidonique (AA\*). Le métabolisme de l'AA\* par une cyclooxygénase (Cox) ou une lipoxygénase conduit respectivement à des prostaglandines (PGs) et à des leucotriènes, qui sont des médiateurs de l'inflammation [74]. 3) Les **PLC** et les sphingomyélinases (SMase) produisent de la phosphocholine (PChol) ou de la phosphoéthanolamine (PEA), des précurseurs de phosphate, qui pourraient être hydrolysés par une phosphatase comme la PHOSPHO1 [75]. 4) La mise en évidence d'une activation de la **PLD**, après stimulation des cellules via des récepteurs membranaires, indique son action dans le remodelage de la membrane plasmique et/ou dans la transduction des signaux intracellulaires [76]: l'exocytose et la sécrétion [77, 78], la réorganisation agoniste-dépendante du cytosquelette [79, 80], la différenciation [81, 82], la prolifération et la survie cellulaires [83].



**Figure 10:** Implication des phospholipases dans les étapes initiales du processus de la minéralisation. A : Localisation de l'action des phospholipases au sein d'une cellule capable de minéraliser. B : Schéma d'une VM mature dans la matrice extracellulaire. Les phospholipases PLA, PLC et PLD contribuent à déstabiliser la structure des membranes des VMs [73]. Figure modifiée à partir de la référence citée.

La phospholipase D est une enzyme qui hydrolyse majoritairement la phosphatidylcholine en PA et en choline. (Fig.11) Une autre activité caractéristique pour les PLDs chez les mammifères et les plante est la transphosphatidylation dans laquelle l'alcool primaire sert de capteur pour le phosphatidyl (Fig.11). Il existe deux grandes familles de PLD chez les mammifères : les PLDs non activées par phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP2) et les PLDs activées par PIP2. Ces dernières sont codées par deux gènes différents *PLD1* et *PLD2*.

Le gène PLD1 est localisé sur le bras long (q) du chromosome 3 (3q26) et il est défini par 31 exons, dont 27 donnent l'expression de quatre variantes d'épissage [84]. Les variants d'épissage de la PLD1 comprennent PLD1a, PLD1a2, PLD1b et PLD1b2 [85, 86]. La forme la plus longue est la PLD1a dont la séquence protéique est formée de 1072 acides aminés et de 120 kDa en poids moléculaire [87]. La PLD2 a été clonée à partir d'embryons de souris [88] et plus tard à partir des lymphocytes B humains [89]. Le gène *PLD2* est situé sur le bras court (p) du chromosome 17 (17p13) [90] et il code pour une protéine de 933 acides aminés de poids moléculaire de 106 kDa [88]. La PLD2 possède deux variantes d'épissage, PLD2a et PLD2b, qui sont fonctionnellement indiscernable [91]. Les deux enzymes PLD1 et PLD2 sont largement exprimées dans une variété de tissus et de cellules [92, 93]. PLD1 et PLD2 ont approximativement 50% d'homologie. Elles possèdent un centre catalytique très conservé, entouré de régions N et C terminales de séquences variables [94]. De nombreux agonistes sont capables de stimuler la PLD comme des hormones, des neurotransmetteurs, des facteurs de croissance, des cytokines, des antigènes et des molécules d'adhésion cellulaire [95]. La **PLD1** est activée par les petites protéines G des familles ARF (Facteur de ribosylation d'ADP-) et Rho, et par les protéines kinases C (PKC) [96]. Son activité basale est faible. La **PLD2** possède une activité basale forte *in vitro*, et qui est peu ou pas du tout stimulée par les protéines activatrices de la PLD1 [88]. Certains travaux ont décrit une activation de la PLD2 par PKC mais d'une amplitude beaucoup plus faible que celle de la PLD1 [97].



**Figure 11 :** Réactions d'hydrolyse et de transphosphatidylation de la PLD. La première partie de la réaction implique la formation d'un intermédiaire, le complexe acide phosphatidique (PA)-PLD. PA est fixé par une liaison covalente à une histidine. Soit l'eau soit un alcool primaire peut agir en tant que nucléophile dans la deuxième étape de la réaction. En présence de l'eau, le produit de réaction est le PA et en présence d'alcool primaire (comme le butanol, souvent utilisé), le produit de la réaction est le phosphatidylalcool (ou phosphatidylbutanol (Pbut)) [98]. Figure modifiée à partir de la référence citée.

## II.2. Localisation tissulaire et subcellulaire de la phospholipase D

Les isoformes de la PLD, PLD1 et PLD2 sont exprimées dans presque tous les tissus de mammifères. Elles sont à la fois exprimées fortement dans le cœur, le cerveau et la rate. PLD1 présente une faible expression dans les leucocytes du sang périphérique et PLD2 est faiblement exprimée dans le foie et le muscle squelettique. Alors que PLD1 et PLD2, catalysent la même réaction, et utilisent des substrats similaires pour générer le PA ou la transphosphatidylation, ces enzymes sont différenciellement localisées à l'intérieur de la cellule. Il y a quelques divergences dans les rapports de localisation subcellulaire de chaque isoforme de la PLD, mais cela pourrait être dû à des différences du système cellulaire, les conditions de croissance ou les méthodes de détection (de fractionnement subcellulaire ou immunofluorescence des protéines marquées). Les isoformes sont trouvées dans divers organites, tels que, l'appareil de Golgi, les endosomes, le noyau, les lysosomes, la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique [99-103].

### *II.2.1 PLD1 et sa localisation subcellulaire*

Il est généralement admis que la PLD1 est localisée dans les membranes périnucléaires, y compris celles des endosomes, et de l'appareil de Golgi [88, 104]. Différentes régions de la protéine contribuent à la localisation subcellulaire basale. Des mutations ponctuelles ont été faites pour déterminer la contribution de ces différentes régions. La localisation basale de la PLD1 dépend du domaine PH, qui comprend une région acide (résidus 252 et 253) qui est nécessaire pour l'interaction avec le phosphatidylinositol 1, 4, 5 triphosphate (IP3), ainsi que des résidus conservés de tryptophane dans une hélice  $\alpha$  essentiels pour l'activité catalytique [105]. La palmitoylation de la PLD1 sur deux résidus de cystéine dans le domaine PH entraîne une localisation basale de la protéine à la membrane des organites [106]. Des mutations ponctuelles sur ces résidus altèrent la palmitoylation conduisant à une localisation aberrante de la protéine. Les résidus C-terminaux de la PLD1 pourraient également être nécessaires pour une localisation endosomale [104]. Les PLD1a et PLD1b n'ayant pas ces résidus ne se localisent pas dans les endosomes. La PLD1 dépourvue de cette région, ne peut pas être pliée correctement, et cela pourrait aboutir à sa localisation aberrante. De plus, il a été suggéré que l'extrémité C-terminale est importante pour l'activité catalytique [107]. Des mutations ponctuelles inactivant l'enzyme PLD1b (K466E et K860E) montrent une localisation endosomale périnucléaire [104]. Il convient de noter que des domaines individuels de la PLD1 n'ont pas une localisation similaire par rapport à l'enzyme entière [108, 109]. Ceci suggère que de multiples régions de l'enzyme participent à la localisation basale. Lors de la stimulation des cellules, PLD1 subit une translocation vers la membrane plasmique ou vers les endosomes. Cependant, selon le type de stimulation, la translocation peut être différente. Par exemple, la stimulation des cellules Cos7 par le sérum aboutit à une translocation vers les endosomes et vers la membrane plasmique, tandis que la stimulation par 12-myristate 13-acétate (PMA) aboutit à une translocation vers la membrane plasmique [108]. La translocation de la PLD1 vers la membrane plasmique en réponse à la stimulation de la cellule est due à la liaison au PIP2 entre les domaines polybasiques HKD [108]. Des mutations ponctuelles dans cette région polybasique, y compris la mutation de résidus arginines fortement conservés 691 et 695, altèrent la translocation de la PLD1 vers la membrane plasmique lors de la stimulation. Enfin, les domaines PX et PH facilitent la réorientation vers des membranes intracellulaires spécifiques [108]. L'activation de la PLD nucléaire par un analogue de GTP non-hydrolysable, guanosine 5'-O-[gamma-thio] triphosphate (GTP $\gamma$ S), est induite via Rho et n'implique pas Arf [110]. La séquence nucléaire de localisation (NLS) a été identifiée entre les résidus 553 et 564 pour PLD1b. NLS se lie à

l'importin- $\beta$  et facilite le transport actif de la PLD1b dans le noyau. La séquence NLS existe dans la région de la boucle entre les motifs catalytiques HKD de PLD1, tandis qu'elle n'existe pas dans la PLD2. Une mutation quelconque sur un ou la totalité des résidus conservés dans la séquence NLS altère la localisation nucléaire [111].

### *II.2.2 PLD2 et sa localisation subcellulaire*

La PLD2 est généralement localisée à la membrane plasmique dans des conditions basales et se diffuse dans des vésicules [88]. La PLD2 se lie avec  $\beta$ -actine [112] et en réponse à une stimulation par le facteur de croissance épidermique (EGF), elle se localise dans des bourgeonnements de la membrane [113]. PLD1 et PLD2 peuvent être co-localisées à la membrane périnucléaire et plasmique selon les conditions basales [114].

## **II.3. Structure de la phospholipase D**

La caractéristique essentielle des PLDs des mammifères est la présence de deux domaines catalytiques. Ces domaines sont définis par un motif conservé contenant l'histidine, la lysine et les résidus d'aspartate qui coordonnent la réaction de transphosphatidylation. Par conséquent, ces domaines sont appelés domaines HKD. (Fig. 12) En outre, les deux produits de gènes de PLDs de mammifères ont une homologie de séquence dans le domaine pleckstrine (PH), le domaine de liaison avec PIP<sub>2</sub>, le domaine Phox (PX) et d'autres régions conservées ayant des fonctions inconnues. (Fig. 12) En outre, la PLD1 contient une boucle, séquence entre les deux domaines HKD, qui n'est pas présente dans la PLD2. (Fig.12) Le noyau catalytique de la PLD est formé par deux motifs HKD qui se replient l'un sur l'autre pour créer le site actif. La présence de l'un ou de l'autre domaine HKD n'est pas suffisante pour l'activité de la PLD. L'analyse des mutations ayant lieu dans ces domaines, a conduit à une compréhension détaillée du mécanisme catalytique induit par la PLD, dans lequel les histidines de deux domaines HKD coordonnent directement la réaction de transphosphatidylation [115, 116]. Le modèle catalytique actuel de la PLD a des conséquences importantes sur la régulation de l'enzyme. L'activité catalytique nécessite que les histidines des deux domaines HKD soient à proximité du substrat. Par conséquent, l'orientation des domaines HKD est essentielle pour l'activité catalytique. La régulation de l'activité de PLD serait contrôlée par une interaction des protéines modulatrices avec la PLD, affectant son activité en influençant l'orientation des domaines HKD [107]. La présence d'une boucle est unique à la PLD1. La suppression de cette boucle entraîne une activité basale élevée [117]. L'insertion de cette séquence dans la PLD2 diminue son activité [118]. Ces résultats suggèrent



que la boucle favorise l'auto-inhibition de la PLD. L'extrémité N-terminale de la PLD1 semble également être impliquée dans l'auto-inhibition de l'activité de PLD, ainsi que dans la régulation contrôlée par la protéine kinase (PKC). La délétion de la partie N-terminale de PLD1 augmente son activité basale et donne une enzyme peu sensible à l'activation par le PMA qui est un activateur de la voie PKC [109]. Cette région joue donc un rôle important dans l'activation de l'enzyme par les PKC. La suppression du domaine PX entraîne l'activation de PLD1, ce qui suggère que ce domaine peut également participer à l'auto-inhibition [117]. Le domaine PH qui lie spécifiquement le PIP2 ou PIP3 n'est pas essentiel pour l'activité catalytique des deux isoformes PLD1 et PLD2 [117, 118]. Par contre, une deuxième région de liaison avec le PIP2 entre les deux domaines HKD a été identifiée. L'interaction de ce domaine avec le PIP2 est essentielle pour l'activité catalytique des PLDs, chez les mammifères et la levure [119]. (Fig.12)



**Figure 12 :** Topologie et localisation des domaines des deux isoformes mammaliennes de la phospholipase D.

## II.4. Régulation des phospholipases D

Les activités des phospholipases D sont régulées par des protéines G, le facteur de ribosylation de l'ADP, le Ral GTPase, des protéines kinase C et des tyrosines kinases (Fig. 13).

### II.4.1. Régulation par les protéines G :

Il existe un grand nombre de protéines liant le GTP, qui sont généralement dénommées protéines G. Celles-ci existent sous deux états conformationnels dépendants de la nature du nucléotide fixé et correspondant à des états fonctionnels différents de la protéine, la forme liée au GTP étant active alors que la forme liée au GDP est inactive. Elles jouent ainsi le rôle de commutateurs cellulaires. Seule la forme active est capable de fixer les effecteurs [120].



#### II.4.1.1. Famille des protéines Rho

Les protéines Rho appartiennent à la superfamille Ras de petites protéines liées au GTP et qui sont des protéines G monomériques de faible poids moléculaire (20 à 40 kDa). Il existe une centaine de protéines dans cette superfamille. Chez la levure et chez les mammifères, elles sont réparties en cinq familles : Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf et Ran [121]. La famille Rho régule l'activation de la PLD qui dépend de nombreux agonistes. L'activité de la PLD dépendante de la GTPγS est bloquée par l'inhibiteur de dissociation du complexe Rho/GDI (RhoGDI) dans les neutrophiles [122]. La plupart des travaux vérifiant l'implication de Rho comme activateur de la PLD sont basés sur l'utilisation des toxines bactériennes pour bloquer la fonction de Rho dans les cellules. L'exotoxine C3 de *Clostridium Botulinum* inactive la protéine Rho par une ADP-ribosylation [123], tandis que la toxine B de *Clostridium Difficile* inhibe la fonction de la protéine Rho par une réaction de glycosylation [124]. L'utilisation de ces toxines a facilité l'identification de molécules régulant Rho comme l'acide lysophosphatidique (LPA), le PMA, et l'endothéline I (peptide vasoconstricteur) qui stimulent l'activité de la PLD dans les fibroblastes de rat [125]. L'expression des mutants dominants négatifs de Rho a bloqué l'activation de la PLD par le PMA dans des cellules adénocarcinomes humaines A549 [126]. Cependant, l'activation directe de la PLD2 par Rho n'a pas été observée même dans des conditions optimisées [118]. Par conséquent, il existe d'autres mécanismes d'activation de la PLD induite par Rho tels que l'action de la phosphatidylinositol 5-kinase (PIP5kinase) qui phosphoryle le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI(4)P) pour générer le PIP2 [127, 128]. (Fig.13) PIP2 est un cofacteur nécessaire à la fois pour l'activité de PLD1 et celle de PLD2, et il est essentiel pour la stimulation dépendante de GTPγS [129]. D'autre part, Rho pourrait activer la PLD indirectement via l'activation de la Rho kinase, ROCK, puisque l'expression de mutants catalytiquement inactifs de Rho kinase bloque l'activation de la PLD induite par le récepteur m3 de l'acétylcholine [130].

#### II.4.1.2. Le facteur de ribosylation de l'ADP

Chez les mammifères, il existe six types de facteurs de ribosylation de l'ADP (ARF) qui sont subdivisés en trois classes : I, II et III. Les ARFs appartenant aux classes I et II se trouvent principalement dans l'appareil de Golgi et également sur différentes membranes des endosomes où ils jouent un rôle dans le remodelage d'actine et dans le trafic vésiculaire. ARF6 est l'unique membre de la classe III. Il est localisé à la membrane où il agit au cours de l'endocytose, la phagocytose, le recyclage des récepteurs et pendant les événements cellulaires menant à la réorganisation du cytosquelette d'actine avec la formation de lamellipodes et aux ondulations de la membrane. Les protéines ARF ont été identifiées

comme principaux activateurs de la PLD dans le cytosol des cellules neuronales du cerveau du bovin [131] et dans les cellules HL-60 [132]. (Fig.13) Les protéines ARF agissent comme des médiateurs de l'activation de la PLD en présence concomitante d'autres agonistes tels que l'insuline [133], le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) [134], l'angiotensine II [135], l'endothéline-1 [135], la N- formyl-méthionyl- leucyl –phénylalanine (fMLP) [136]. De plus elles stimulent les récepteurs muscariniques m3 [137]. L'ajout de toxines bactériennes est utilisé afin d'exclure la voie régulée par des protéines Rho dans l'activation de la PLD par des agonistes spécifiques. Par exemple, l'ajout de ces toxines a montré que l'activation de la PLD induite par l'insuline, le PDGF et le PMA est indépendante de Rho dans les fibroblastes HIRcB [133, 134]. De même, l'induction de l'activité de la PLD par l'angiotensine II, l'endothéline-1, ou le PDGF dans les cellules musculaires lisses vasculaires A10 semble être insensible au traitement à l'exotoxine C3 [135]. Toutes les protéines ARF semblent être en mesure d'activer la PLD *in vitro* [88, 118, 138]. En effet, des mutations qui inactivent catalytiquement ARF1 et ARF6, inhibent l'activité de la PLD dépendante des agonistes [134, 135]. Ces résultats suggèrent que l'activation de la PLD induite par ARF n'est pas spécifique à une isoenzyme particulière d'ARF. L'activation de la PLD par ARF est controversée , principalement parce que les classes I et II de la famille ARF activant la PLD n'ont pas été détectées dans les membranes plasmiques [139]. Cependant, la découverte d'un facteur d'échange pour ARF, ARNO (ARF nucléotide site opener) permettant l'acheminement d'ARF1 vers la membrane plasmique, montre que l'association de la protéine ARF1 avec la membrane plasmique est induite sous certaines conditions [140]. De plus, la mutation au niveau de ce facteur inhibe l'activité de la PLD dépendante de l'insuline, ce qui suggère que la famille ARNO est responsable de l'activation de la PLD dépendante de l'insuline.

La fixation de l'insuline sur son récepteur induit une autophosphorylation de plusieurs tyrosines de la sous-unité  $\beta$  intracellulaire. Cette autophosphorylation induit des changements de conformation qui, à leur tour, induisent l'activation de l'activité tyrosine kinase. Le récepteur de l'insuline peut alors phosphoryler différentes protéines cibles effectrices comme le substrat du récepteur de l'insuline (IRS-1). Celle-ci produit une activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui produit du PIP3 qui induit le recrutement d'ARNO du cytoplasme vers le récepteur qui, à son tour, recrute l'ARF. Cette association entre ARNO et ARF se fait par un échange d'un nucléotide (guanine) vers ARF. L'ARF couplé au GTP active directement la PLD.

#### *II.4.1.3 Protéine Ral GTPase*

Cette protéine monomérique agit comme un régulateur positif de l'activité de la PLD, mais seulement en présence d'ARF [141]. Ral induit l'activation de la PLD dans des cellules transformées par les deux oncogènes v-Src [142] et v-Ras par une interaction directe avec le complexe ARF-PLD1 [143]. Dans les cellules transformées par v-Raf, Ral favorise l'activité de la PLD en combinaison avec des protéines Rho [144]. RalA participe à l'activation de la PLD dans les cellules HEK293 stimulées par le PMA [145]. (Fig.13)

#### *II.4.2. Régulation par les protéines kinases*

##### *II.4.2.1. Par les protéines kinases C*

L'addition du PMA, activateur de PKC, stimule la PLD [146, 147]. (Fig.13) Une diminution de PKC $\alpha$  et non de PKC $\beta$  entraîne une diminution significative de l'activité de la PLD [148]. L'activation de la PLD dépendante de PMA dans les neutrophiles nécessite de l'ATP [149]. En outre, cette activation est fortement réduite par les inhibiteurs de PKC tels que la staurosporine ou RO 31-8220 qui agissent en compétition sur le site de liaison de l'ATP avec PKC [150]. Par contre, il a été montré que la PLD1 pourrait être phosphorylée *in vitro* sur les résidus sérine et thréonine et que la phosphorylation aurait un effet négatif sur l'activité de la PLD1 [151]. Donc la PKC a un double effet sur la régulation de la PLD. En effet, la PKC peut moduler l'activité de la PLD par deux mécanismes distincts: un mécanisme dépendant de l'ATP et un autre indépendant de l'ATP. En outre, l'activité kinase de PKC peut être à la fois un inhibiteur et un activateur de l'activité de la PLD [152].

##### *II.4.2.2. Par les tyrosines kinases*

Les récepteurs ayant une activité d'autophosphorylation de type tyrosine kinase, comme les récepteurs d'EGF et de PDGF, pourraient activer la PLD dans certains types de cellules. Le pervanadate, qui augmente le niveau de la phosphorylation de tyrosine en inhibant les tyrosines phosphatases, stimule l'activité de la PLD dans des cellules HL60 et les neutrophiles [153, 154]. À la fois l'activité de la PLD et l'accumulation de protéines phosphorylées au niveau de leur tyrosine sont sensibles aux inhibiteurs de la tyrosine kinase, ce qui suggère un lien entre l'activité de la PLD et les protéines phosphorylées [154]. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> active la PLD dans différents types de cellules [155] et cette activation est sensible aux inhibiteurs de la tyrosine kinase [156, 157]. En présence de vanadate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> active la PLD et induit la phosphorylation de la PLD1 sur les résidus tyrosines, de la PKC $\alpha$  et du récepteur PDGF dans les cellules les fibroblastes Swiss 3T3 [151].

### *II.4.3. Régulation par le PIP2*

Le PIP2 est connu en tant que substrat de la PLC pour la production des seconds messagers. Il intervient aussi dans l'activation ou le recrutement d'une variété de protéines régulatrices de l'actine, les canaux ioniques et d'autres protéines de signalisation, y compris la PLD, par interaction directe [158]. La synthèse de PIP2 par PIP5K est étroitement régulée par des petites GTPases et par le PA. PIP2 est un cofacteur essentiel pour l'activité de la PLD [129, 131, 158-160]. (Fig.13) Ainsi, la diminution de PIP2 au niveau cellulaire entraîne une diminution de l'activité de PLD [161, 162]. Par ailleurs, la synthèse de PIP2 par PIP5K peut être directement stimulée par le PA qui est un second messenger produit par la PLD [163, 164]. La stimulation réciproque entre PLD et PIP5K permet une boucle de production de PA et de PIP2. (Fig.13) Les activités de la PLD et PIP5K sont sous le contrôle de GTPases de la famille Rho et Arf, qui sont des régulateurs bien définis du transport membranaire et de l'organisation de l'actine. PLD1 et PLD2 ont un domaine PH qui peut servir à lier le PIP2 et à ancrer la PLD sur les compartiments membranaires *in vivo* [165]. Quelques protéines sont capables d'induire une diminution de l'activité de la PLD comme le synaptojanin [162], la fodrine [166] et la protéine d'assemblage de la clathrine 3 (AP3) [167]. Synaptojanin et fodrine ne sont pas des inhibiteurs directs de la PLD. Le premier est une phosphatidylinositol 5-phosphatase qui inhibe l'activité de la PLD en hydrolysant le PIP2, tandis que le deuxième réduit le niveau d'expression de PIP2 [161]. En revanche, l'effet inhibiteur de l'AP3 est le résultat de sa liaison avec la PLD [167]. Enfin, la PLD2, qui dépend également de PIP2 montre une forte activité basale qui est inhibée par un facteur protéique stable nommé synucléine [168].

## **II.5. Fonctions cellulaires des phospholipases D**

### *II.5.1. Endocytose et exocytose*

L'utilisation d'alcools primaires pour bloquer la formation de PA par la PLD a abouti à la première observation de l'implication de la PLD dans l'**exocytose**. Une augmentation significative de phosphatidyléthanol (PEt) a été observée dans les cellules HL60 traitées avec de l'éthanol au cours de la sécrétion des granules [169]. L'ajout de 1 % de n-butanol est suffisant pour réduire la libération de vésicules sécrétoires à partir de l'appareil de Golgi [170]. La surexpression de la PLD1, et non de la PLD2, dans les cellules neuroendocriniennes favorise l'exocytose [171]. L'utilisation de n-butanol, des mutations qui inhibent l'activité catalytique de la PLD et l'utilisation d'ARN interférent ont permis de mettre en évidence l'action de la PLD au cours de l'**endocytose**. La PLD participe à l'internalisation de plusieurs

récepteurs comme le récepteur à l'angiotensine II et le récepteur métabotrope du glutamate de type I (mGluR1) [102, 172]. L'activité de la PLD est nécessaire pour l'internalisation du récepteur de l'EGF stimulé par des agonistes. L'utilisation de n-butanol diminue cet effet, par contre la surexpression de la PLD1 ou la PLD2 augmente l'internalisation tandis que la surexpression de la PLD1 ou la PLD2 catalytiquement inactive diminue cet effet [173]. Par ailleurs, la PLD1 est impliquée dans l'autophagie [174].

#### *II.5.2. Remaniement des cytosquelettes d'actine*

L'adhésion cellulaire, la diffusion et la migration sont des processus qui régulent le développement embryonnaire, l'inflammation et les métastases [175, 176]. Le PA a été démontré comme une molécule de signalisation importante qui règle les changements dynamiques dans le cytosquelette d'actine et myosine qui sont essentiels pour les phénomènes cités plus haut. Pendant le processus de l'adhérence, la forme de la cellule change considérablement de celle d'une sphère en suspension à celle adhérente, allongée et plate [177]. Le cytosquelette d'actine-myosine prédétermine les contraintes structurales au cours de la transition entre les deux formes. En outre, le cytosquelette d'actine entraîne la diffusion des cellules et le mouvement cellulaire [177]. L'action de la PLD dans le réarrangement du cytosquelette de l'actine a été mise en évidence par l'ajout de la PLD de *Streptomyces chromofocus* dans les fibroblastes de hamster IIC9 [178]. Le traitement des fibroblastes de hamster IIC9, des cellules endothéliales aortiques du porc et des cellules épithéliales des voies aériennes humaines avec des concentrations physiologiques de l'acide lysophosphatidique (LPA) ont favorisé la formation de fibres de stress d'actine [79, 179-181]. L'arginine Vasopressine (AVP), activateur de la PLD et inducteur de la différenciation myogénique, stimule le remodelage du cytosquelette d'actine favorisant la formation des fibres de stress dans les myoblastes squelettiques L6 de rat [182]. La formation des fibres de stress dépend de la protéine Rho [183]. L'agoniste activant la protéine Rho induit l'activation de la PLD1 et la formation des fibres de stress [79, 182]. En revanche, l'augmentation induite de LPA par la PLD est nécessaire pour l'activation de la protéine Rho et la formation de fibres de stress [179]. Cependant, il n'est pas clair si la PLD1 ou la PLD2 est stimulée et si la PLD1 agit en amont ou en aval de l'activation de la protéine Rho. Néanmoins, des mutants de RhoA ne peuvent pas se lier à la PLD1 ni l'activer et sont incapables de promouvoir la formation de fibres de stress [184].

### *II.5.3. Différenciation cellulaire*

La PLD agit sur la différenciation de divers types de cellules mais les mécanismes restent encore mal connus [185-191]. Le traitement des cellules leucémiques promyélotiques humaines HL-60 par du DMSO 1.25% favorise leur différenciation en granulocytes marquée par l'expression de CD16b. Cette différenciation est accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour la PLD2 ainsi qu'une diminution de l'expression de mTOR et S6K [192]. Cette expression génomique est corrélée avec l'expression protéique et l'activité de la PLD [185]. Les cellules HL60 non différenciées et transfectées par PLD2 nécessitent trois jours pour exprimer le marqueur de différenciation CD16b, tandis qu'en présence de DMSO, il apparaît au bout de quatre jours. La PLD2 réduit le temps nécessaire pour la différenciation de ces cellules [192]. De plus, non seulement l'expression de la PLD2 mais également celle de PLD1 sont affectées au cours de la différenciation cellulaire. Une surexpression de la PLD1 au cours de la différenciation des cellules neuronales a été observée [193]. En outre, l'activation de la PLD par PMA via PKC, ou par l'AVP via l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G (V1aR), favorise la différenciation des myoblastes L6 [82]. D'autre part, la différenciation des cellules MG-63 cultivées sur des surfaces rugueuses de titane est augmentée, impliquant spécifiquement la PLD1 [194].

### *II.5.4. Prolifération cellulaire et apoptose*

L'expression accrue de la PLD et de son activité enzymatique ont été observées dans plusieurs types de cancers humains, y compris ceux du sein, du rein, cerveau et colorectal [195-198]. Une grande variété de facteurs extracellulaires comme le PDGF, le FGF et l'EGF stimulant la prolifération cellulaire est capable d'augmenter de manière significative l'activité de la PLD dans différentes lignées cellulaires [199-201]. La sérotonine (5-HT) en se fixant sur son récepteur induit une activation de la PLD dans les CMLs de l'artère pulmonaire. Suite à cette activation, la PLD par son produit PA induit la prolifération de ces cellules [202].

La surexpression de la PLD est capable de promouvoir la croissance et la prolifération cellulaire [203, 204]. Inversement, la diminution de l'activité de la PLD par des approches génétiques ou biochimiques peut augmenter l'apoptose des cellules cancéreuses, montrant que l'action de la PLD favorise la prolifération cellulaire [204, 205]. En effet, l'ajout d'un inhibiteur spécifique de la PLD2, VU0364739, diminue la prolifération des cellules MDA-MB-231 et induit une augmentation de l'activité des caspases 3/7 indiquant que cet inhibiteur provoque une diminution de la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose [206]. Dans de nombreux modèles cellulaires, l'inhibition de la PLD par des alcools primaires provoque l'arrêt de la prolifération. L'inhibition de la PLD par ARNi spécifique diminue la quantité de



p70S6K phosphorylée dans les cellules mélanome B16 [207]. Au niveau moléculaire, la PLD intervient dans des voies de signalisation oncogénique impliquant MMPs, p53, la cible mammalienne de la rapamycine (mTOR) et Ras [208-213]. La PLD facilite également l'activation de la cascade de la protéine kinase (MAPK) [205]. La voie des MAP Kinases est connue pour être impliquée dans les voies de signalisation mitogénique ce qui pourrait expliquer en partie les effets de la PLD.

Le traitement des cellules avec le PA supprime l'expression de p53 [214] ou stabilise le complexe mdm2/p53 (mdm2 est une E3 ubiquitine ligase qui en s'associant à p53 aboutit à sa dégradation) [210]. La PLD régule l'activité de mTOR qui est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille de PI3K et qui agit comme un régulateur de la croissance et de la division cellulaire [215]. La capacité de la PI3K à moduler l'activité de mTOR est bien établie [216].

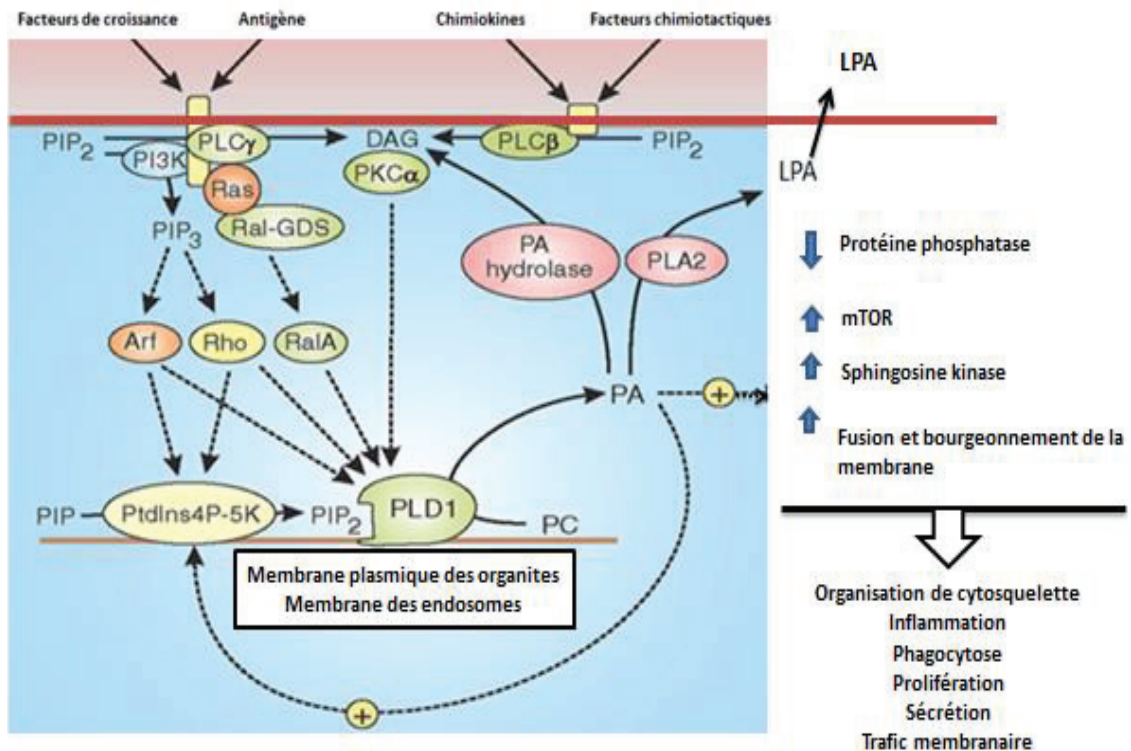
#### *II.5.5. Trafic vésiculaire*

Le trafic vésiculaire comprend trois étapes: le bourgeonnement à partir du compartiment donneur, le transport et la fusion de la vésicule avec le compartiment accepteur. La mise en évidence de l'action de la PLD dans le trafic vésiculaire s'est fortement appuyée sur l'ajout d'alcools primaires pour bloquer la formation de PA par la PLD, et plus récemment, sur l'utilisation des inhibiteurs de la PLD. Les isoformes PLD1 et PLD2 des mammifères se localisent différemment aux membranes cellulaires pour induire directement et indirectement des changements dans la courbure de la membrane facilitant l'endocytose/exocytose [101]. Les diverses formes d'ARF sont impliquées dans de nombreuses voies de transport vésiculaire, couvrant toutes les routes cellulaires depuis la membrane nucléaire jusqu'à la membrane plasmique : La PLD1 stimulée par ARF1 a été retrouvée sur la membrane de l'appareil de Golgi [76], tandis que celle stimulée par Arf6 a été retrouvée sur la membrane plasmique [217].

La stimulation de la PLD provoque une redistribution des phospholipides membranaires avec un remplacement de la PC par du PA qui est un lipide fusogène. L'accumulation du PA, plutôt que DAG, induit une courbure de la membrane et facilite l'attachement des vésicules.

Arf et PA déclenchent également le recrutement de complexes protéiques constituant le manteau vésiculaire, incluant au niveau de l'appareil de golgi, le complexe COPI qui comprend 6 polypeptides nommés coatamères [218, 219]. Le PA active la PIP5K, qui génère le PIP2 et induit la translocation de protéines d'enveloppe et des protéines impliquées dans l'attachement des vésicules, y compris la dynamine (une GTPase impliquée dans l'endocytose

et la scission de la membrane) et l'AP180 (une protéine d'assemblage de la clathrine). AP180 inhibe directement l'activité de la PLD [167, 220]. La PLD interagit directement avec la dynamine d'une manière GTP-dépendante. Il a été suggéré que le domaine PX de la PLD2 pourrait servir de domaine de liaison à la dynamine [221].



**Figure 13 :** Modes de régulation de la PLD1 et les fonctions cellulaires associées [222].  
Figure modifiée à partir de la référence citée.



# **CHAPITRE III**

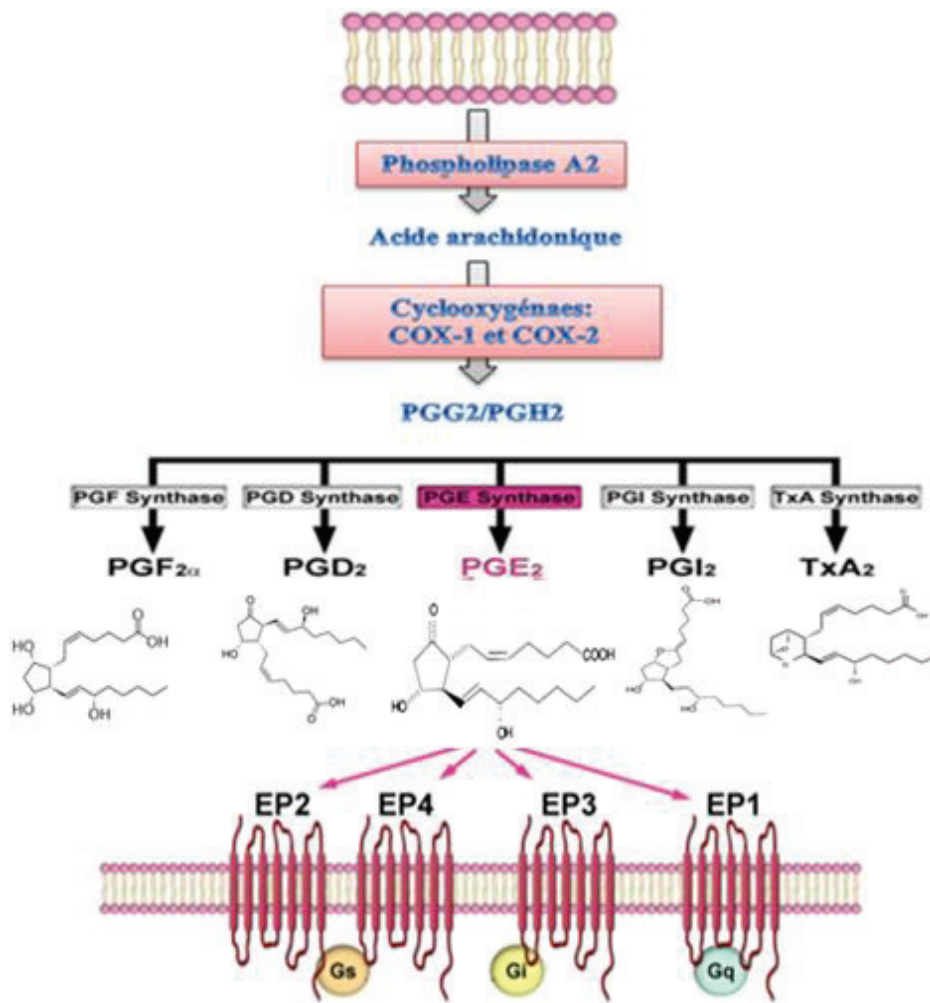
## **LA PROSTAGLANDINE PGE2**

### **III.1. Généralités**

Les prostanoïdes sont des eicosanoïdes synthétisés par le cyclooxygénase (COX). Les prostaglandines, les prostacyclines et les thromboxanes en font partie. Les prostaglandines (PGs) et les thromboxanes sont des métabolites dérivés des acides gras insaturés, tels que l'AA\*, sous l'action des COX-1 et COX-2 et les PG synthases [223]. Ces molécules sont synthétisées à la suite de la réponse cellulaire aux différents types de stimulation. Parmi les prostaglandines, la PG de type E, en particulier la PGE2, qui est un dérivé de l'AA\*, est présente d'une manière ubiquitaire dans les espèces animales et induit des actions polyvalentes. La PGE2 dérive principalement de la voie du métabolisme contrôlée par COX-2 [224, 225]. La PGE2 est un facteur biologiquement actif régulant divers aspects de la réponse inflammatoire et de fonctions au sein des cellules du système immunitaire. Les prostaglandines, en particulier la PGE2, modulent la réponse inflammatoire, la réparation et la régénération osseuse, la vasodilatation et la prolifération. En outre, le TGFβ en induisant la production locale de la PGE2 est impliqué dans la prolifération des ostéoblastes de la souris [226].

### **III.2. Biosynthèse de la PGE2 et sa dégradation**

La PGE2 peut être produite par tous les types cellulaires du corps : les épithéliums, les fibroblastes et les cellules inflammatoires infiltrantes représentant la principale source de la PGE2 dans le cadre d'une réponse immunitaire. Le processus de synthèse de la PGE2 débute par une activité enzymatique de la phospholipase A2 qui libère l'AA\* [227], puis les COX-1 et COX-2 convertissent l'AA\* en PGs de type H2 et de type G2 (PGH2 et PGG2), et les PG synthases catalysent la formation de la PGE2 [228]. (Fig.14)



**Figure 14 :** Biosynthèse de la PGE<sub>2</sub>. L'AA\*, libéré par la phospholipase A<sub>2</sub> à partir des lipides membranaires, est converti en PGG<sub>2</sub> et PGH<sub>2</sub> par les COX- 1 et COX- 2. Les PG synthases produisent, à partir des PGG<sub>2</sub> et PGH<sub>2</sub>, les prostaglandines PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et la thromboxane (TxA<sub>2</sub>). Une fois synthétisée, la PGE<sub>2</sub> diffuse immédiatement et active ses récepteurs spécifiques : EP1, EP2, EP3 et EP4, qui appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Les récepteurs contiennent sept domaines transmembranaires. EP2 et EP4 sont couplés à la protéine G<sub>s</sub>, EP3 est couplé à la protéine G<sub>i</sub> et EP1 est couplé à la protéine G<sub>q</sub> [238].

Les deux isoformes de la COX catalysent les mêmes réactions, mais la COX- 1 est exprimée de manière constitutive tandis que la COX- 2 est induite de façon transitoire régulée par des cytokines et des facteurs de croissance. Le taux de synthèse de la PGE<sub>2</sub> et le processus inflammatoire qui en résulte peuvent être affectés par la disponibilité locale de l'AA\*. Selon les conditions physiologiques, le taux de synthèse de la PGE<sub>2</sub> est contrôlé par l'expression et l'activité de la COX-2. La PGE<sub>2</sub> est éliminée rapidement des tissus et de la circulation [229]. La vitesse de dégradation de la PGE<sub>2</sub> dans les tissus individuels est contrôlée par l'activité de

la 15-hydroxy prostaglandine déshydrogénase (15-PGDH) [230]. La suppression de l'activité de 15-PGDH est observée dans de nombreuses formes de cancer [231-235] ou également dans la peau irradiée aux UV [236]. Les cellules cancéreuses apoptotiques peuvent moduler la production des prostanoïdes en augmentant l'expression de la COX-2 des macrophages et ceux des PGE synthases -1 microsomales, tout en inhibant la 15-PGDH [237].

### **III.3. Le mode d'action de la PGE2**

Les effets hétérogènes de la PGE2 s'expliquent par l'existence de quatre récepteurs différents qui sont désignés par EP1, EP2, EP3 et EP4. (Fig.14) La diversité fonctionnelle résulte aussi de multiples variantes d'épissage du récepteur EP3 qui existent sous, au moins, huit formes chez les humains et trois formes chez les souris [239, 240]. L'identification moléculaire de ces récepteurs a été réalisée par le clonage de leur ADNc qui a révélé que ces récepteurs sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) [241]. Des analyses ultérieures ont montré que les différents types de récepteurs ont des propriétés biochimiques et des localisations tissulaires et cellulaires distinctes.

#### *III.3.1. La structure des récepteurs*

Les séquences des acides aminés des récepteurs chez la souris montrent que les récepteurs EP1, EP2, EP3 et EP4 se composent de 405, 362, 366, et 513 acides aminés respectivement. EP4 possède une longue extrémité C-terminale intracellulaire et une troisième boucle intracellulaire relativement longue. Le récepteur EP1 a également une troisième boucle longue, alors que les récepteurs EP2 et EP3 ont une structure plus compacte. Une caractéristique du récepteur EP3 le distinguant des autres récepteurs EPs, est l'existence de multiples variantes générées par l'épissage alternatif de l'extrémité C-terminale. Chez la souris, l'épissage alternatif aboutit à la formation de trois isoformes contenant une extrémité C-terminale longue de 30, 26 ou 29 acides aminés [242, 243]. Ces isoformes ont des propriétés de liaisons similaires avec le ligand, mais qui conduisent à des voies de signalisations différentes. Ces isoformes d'épissages multiples existent également chez d'autres espèces, y compris le rat, le lapin, le boeuf, et l'humain [244]. L'alignement entre les différents récepteurs de la PGE2 montre une homologie faible de 28 à 30% [244].

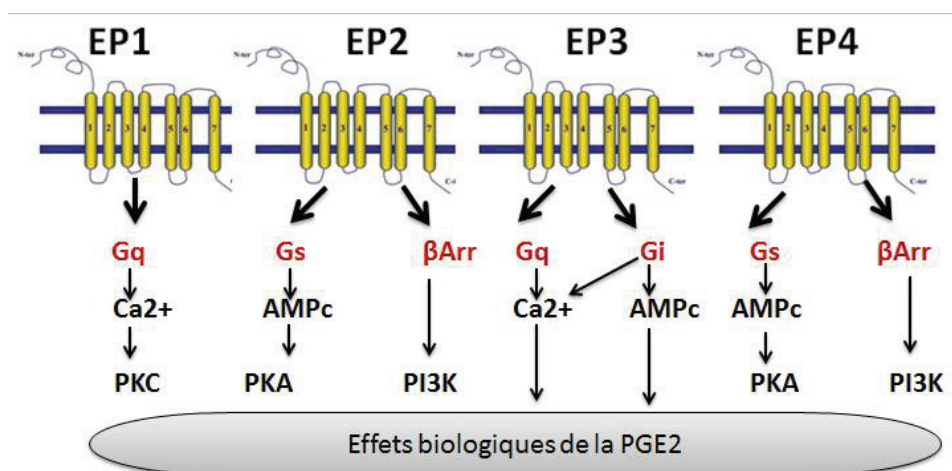
#### *III.3.2. Localisation tissulaire et cellulaire des récepteurs EPs*

Des analyses par Northern blot et par hybridation *in situ* ont montré que chaque récepteur est spécifiquement distribué dans le corps et que leur niveau d'expression est variable dans les tissus. Parmi les quatre EPs, les récepteurs EP3 et EP4 sont largement distribués dans presque

tous les tissus des souris examinées. En revanche, la distribution du récepteur EP1 est limitée à plusieurs organes, comme le rein, le poumon et l'estomac, mais EP2 est le moins abondant des récepteurs EPs. Dans les tissus, chaque récepteur EP a une localisation cellulaire distincte. Par exemple, dans le rein, EP3 est exprimé dans l'épithélium tubulaire, la branche ascendante épaisse et les conduits du collecteur cortical dans la médullaire externe. Par contre, EP1 est localisé dans les conduits papillaires alors qu'EP4 est situé dans le glomérule [245]. Cette distribution distincte des EPs semble être corrélée avec la quantité de PGE2 induite par le transport d'ions, la réabsorption de l'eau et la filtration glomérulaire. Une distribution similaire de ces EPs dans le rein a été identifiée chez les lapins et les humains [246, 247]. Par contre, ces analyses n'ont pas détecté une expression d'ARNm codant pour EP2 dans le rein.

### III.3.3. Voies de signalisation des récepteurs EPs

Les récepteurs EP3 et EP4 ont une haute affinité pour la PGE2, tandis que les récepteurs EP1 et EP2 nécessitent des concentrations significativement plus élevées de la PGE2 pour une réponse efficace. La signalisation induite par les récepteurs EP2 et EP4 couplés à la protéine Gs se fait par la voie AMPc / PKA / CREB (*Protéine de liaison en réponse de l'AMPc cyclase*) aboutissant à l'augmentation de l'AMPc [248-250]. (Fig.15)



**Figure15 :** Voies de signalisation des différents récepteurs de la PGE2. EP1 est couplé à la protéine Gq et induit la mobilisation intracellulaire de calcium. EP2 et EP4 sont couplés à la protéine Gs et active la voie AMPc/PKA. Ils sont également couplés au récepteur  $\beta$ -Arr activant la voie de PI3K. Le récepteur EP3 est couplé essentiellement à la protéine Gi, mais dans certains types de cellules, EP3 est couplé à la protéine Gq et induit la mobilisation de calcium.

En dépit de leurs fonctions similaires, la voie de signalisation des récepteurs EP2 et EP4 est déclenchée par différents seuils de concentrations de la PGE2 et selon une durée différente. La réponse produite par le récepteur EP4 est rapidement désensibilisée suivant son interaction avec la PGE2. La réponse générée par le récepteur EP2 est résistante à la désensibilisation induite par le ligand, soulignant sa capacité à maintenir l'action de la PGE2 sur une période prolongée et à des instants ultérieurs de l'inflammation [251]. Il a été montré que les deux récepteurs EP2 et EP4 sont également couplés à la  $\beta$ -arrestine ( $\beta$ Arr) activant la PI3K. (Fig.15) La stimulation des récepteurs EP2 et EP4 par des agonistes spécifiques induit l'expression de RANKL produite par les ostéoblastes. Ce dernier est essentiel à la résorption osseuse via la régulation de l'ostéoclastogénèse en se liant au récepteur RANK situé sur les précurseurs des ostéoclastes et les ostéoclastes matures [252, 253]. Contrairement aux récepteurs EP2 et EP4, EP1 et EP3 ne sont pas couplés à la protéine Gs. (Fig.15) La voie de signalisation activée par EP3, est l'inhibition de l'adénylate cyclase via la protéine Gi, résultant en une diminution de production d'AMPc et une activation de la voie MAP Kinase. Cette voie de signalisation n'est pas univoque, puisque l'une des isoformes du récepteur EP3, le récepteur EP3 $\gamma$  peut se coupler à une protéine Gs ou Gq à la différence des isoformes EP3 $\alpha$  et  $\beta$  [254]. L'activation de la protéine Gq par le couple PGE2/EP1 provoque une augmentation intracellulaire de  $Ca^{2+}$  [255] via la voie phospholipase C (PLC)-inositol triphosphate (IP3), bien qu'il ait été suggéré que cette augmentation de  $Ca^{2+}$  puisse être indépendante de la voie de la PLC [256] et qu'EP1 pourrait réguler les canaux calciques. (Fig.15) Le récepteur EP1 exprimé dans des ovocytes de *Xenopus* peut être couplé à TRP5 (un récepteur transitoire potentiel) qui est un facteur activant les canaux calciques.

#### **III.4. La PGE2 et son action dans la formation et la résorption osseuse.**

La fixation de la PGE2 sur ses récepteurs conduit à des actions diverses sur les différents organes et tissus. L'action de la PGE2 sur les récepteurs EPs affecte la résorption osseuse via la voie de l'AMPc et l'expression de RANKL qui sont induites essentiellement par EP4 et partiellement par EP2 dans les ostéoblastes primaires des souris [257]. La même équipe a montré que la résorption osseuse est affaiblie dans des souris n'exprimant plus le récepteur EP4. Des travaux plus récents ont montré que les récepteurs EP2 et EP4 jouent un rôle important dans la régulation de la formation osseuse et la résorption osseuse. Des essais précliniques ont établi qu'un agoniste sélectif du récepteur EP2 augmente la formation osseuse locale et améliore la guérison des fractures des os et le remodelage de l'os [258]. Les agonistes du récepteur EP4 stimulent la formation de l'os sur la surface périostique,

endocorticale et trabéculaire. Ces agonistes ont empêché la perte de l'os spongieux et cortical et ont restauré la masse osseuse dans des modèles de rats ovariectomies. En outre, les agonistes du récepteur EP4 ont également accéléré la réparation osseuse lors de leur administration systémique et locale [258]. Par contre, le récepteur EP4 freine la minéralisation des cémentoblastes via la voie de MMP-13 [259]. L'action de l'agoniste du récepteur EP2 favorise la différenciation des ostéoblastes primaires et des cellules souches mésenchymateuses des souris [260]. Tadashi et al, ont prouvé qu'un agoniste sélectif pour le récepteur EP4 augmente la formation osseuse en stimulant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes. Cette différenciation a été détectée par l'augmentation des facteurs de transcription Runx2 et Ostérix sans effet majeur sur les ostéoclastes de rats [261]. Le traitement par des ultrasons a un effet positif sur la minéralisation des cémentoblastes en activant la voie EP2/EP4 [262]. En outre, un antagoniste sélectif du récepteur EP1 inhibe l'ostéoclastogenèse dépendante de RANKL [263]. Ce résultat est en accord avec le fait que le récepteur EP1 est un régulateur négatif de la réparation osseuse [264]. Par contre, les activateurs des récepteurs EP1 et EP3 augmentent la minéralisation des cémentoblastes en activant la voie dépendante de PKC [265]. Enfin, le rôle précis de chaque récepteur dans la régulation de ces processus dépend du type cellulaire et son état de maturation.

# OBJECTIFS



Notre stratégie de recherche est basée sur la similitude des mécanismes de minéralisation selon les conditions physiologiques et pathologiques. Selon les conditions pathologiques, les cellules qui ne devraient pas minéraliser, comme les cellules musculaires lisses (CMLs) dans le cas de l'insuffisance rénale chronique, empruntent des propriétés similaires aux ostéoblastes et chondrocytes à l'état hypertrophié. En effet, elles ont une forte activité de TNAP et peuvent sécréter du collagène et des VMs facilitant la formation d'HA initiant la calcification vasculaire.

Le métabolisme lipidique, à cause de son apport énergétique et de son influence sur la signalisation intracellulaire, doit moduler la minéralisation induite par les cellules osseuses suggérant l'implication des phospholipases et des prostaglandines dans ce processus. Parmi les phospholipases, la PLD est une enzyme qui hydrolyse la phosphatidylcholine, libérant l'acide phosphatidique (PA) qui est un second messenger impliqué dans de nombreux processus cellulaires. Notre laboratoire a détecté une activité de la phospholipase D dans les VMs qui pourrait agir pendant l'étape initiale de la minéralisation de la MEC. Dans la littérature, il a été décrit que la PLD peut réguler l'expression de la cyclooxygénase-2 (Cox-2) et donc la production de prostaglandines [266].

De plus, la calcification ectopique peut résulter d'une réaction inflammatoire initiée par une augmentation de l'activité de Cox-2 engendrant une production des PGs pouvant se fixer sur les quatre sous types de récepteurs EP1, EP2, EP3 et EP4.

Afin de définir plus précisément les effets du métabolisme lipidique sur la maturation et sur la différenciation des cellules en cellules capables de minéraliser, nous avons sélectionné deux objectifs pour ma thèse :

- 1) Déterminer les actions des différentes isoformes de la phospholipases D (PLD1, PLD2) et leurs niveaux d'expressions au cours de la minéralisation des ostéoblastes primaires et des lignées Saos-2. Des expériences similaires seront effectuées sur des CMLs et les aortes de rat qui peuvent initier des calcifications cardiovasculaires (CCV).
- 2) Déterminer les actions des récepteurs de la PGE2 et leurs niveaux d'expressions lors de la minéralisation physiologique et pathologique. Pour répondre à ces objectifs, nous avons choisi trois modèles cellulaires : les cellules Saos-2 et les ostéoblastes primaires (minéralisation selon les conditions physiologiques) et les CMLs et l'aorte du rat (minéralisation selon les conditions pathologiques).

# **CHAPITRE IV**

## **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

#### IV.1. Matériels et produits :

Les cellules Saos-2 proviennent du Laboratoire ATCC. Les souris (Swiss Webster) ainsi que les rats (*Rattus Norvegicus*, Wistar) proviennent de « Janvier Labs ». Les produits suivants ont été commandés chez **PAA** soit le milieu de culture McCoy's 5A, l'HEPES, la solution tampon de phosphate (PBS), le sérum de fœtus de veau (SVF) ainsi que la glutamine et la trypsine. Les produits suivants ont été achetés chez **Sigma** soit le milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM 4.5g.L<sup>-1</sup>), les amorces pour hPLD1, hPLD2, hGAPDH, l'ostéopontine (OPN, rat), la phosphoprotéine ribosomale de la grande sous-unité P0 (RPLP0) (rat), ostéocalcine (OCN, souris), le GAPDH (souris); le nonidet P40, le chlorure de Cétypyridinium (CPC), le GTP $\gamma$ S, le tween20, l'acide ascorbique (AA) et le  $\beta$ -glycérophosphate ( $\beta$ -GP), le chlorure de sodium (NaCl), l'urée, chloroforme, l'isopropanole et le 4.5-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Les produits suivants commandés chez **Fluka** sont l'alizarine rouge S (AR-S), le chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) et le triton 100x. Les produits suivants commandés chez **Invitrogen** sont l'essai amplex rouge, la transcriptase inverse, Dithiothréitol (DTT) et le lipofectamine (LTX). La libérase, les hexamères et le kit de QPCR ont été commandés chez **Roche**. Les autres produits ont été commandés chez d'autres fournisseurs comme indiqués entre parenthèse : l'anti-hPLD1 pour western Blot (**ABNOVA**), l'anti-hPLD2 (**Dr. S. Bourgoin, Laval University, Canada**), l'anti-hPLD1 pour immunoprécipitation (**Cell Signaling Technology**), l'anti-tubuline (**Santa Cruz Technologies**), le CAY10593 (**Cayman Chemicals**), l'halopemide (**Cayman Chemicals**), le déoxynucléoside triphosphate (dNTP) (**Biofidal**), le kit BCA (**Thermo scientific**), la glycine (**Carl Roth GmbH**), le kit ECL (**Amersham**), la phalloïdine (**Life Science**), le phosphate de sodium dibasique Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (**MERCK**), le P-nitrophényl phosphate pNPP (**Lancaster Synthesis**), le sulfate dodécyl de sodium SDS (**Calbiochem**), le tris (**MP Biomedical**) et le trizol (**Life Technology**). Les instruments utilisés proviennent des fournisseurs comme indiqués entre parenthèses, soit le thermocycleur (**PERKIN ELMER**), le lecteur de plaque (**tecan infinite 200**) et le NanoDrop (**Thermoscientific**).

#### IV.2. Culture cellulaire

##### IV.2.1. Lignées cellulaires Saos-2

La lignée cellulaire d'origine humaine provient d'un ostéosarcome. Ces cellules ont une morphologie épithéliale. Elles ont la propriété d'être adhérente et de minéraliser la MEC, après différenciation. Nous les avons cultivées dans un milieu McCoy's contenant 100 U.mL<sup>-1</sup> de pénicilline, 100 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> streptomycine, auquel nous avons ajouté 15% de SVF (v : v) et

dans une atmosphère humide contenant 5% (v : v) de CO<sub>2</sub> et 95% (v : v) d'air à 37°C dans l'incubateur.

#### *IV.2.2. Ostéoblastes primaires*

Nous avons récupéré les ostéoblastes primaires à partir de calvaria de souris (souche Swiss) âgés de 5-7 jours. Après décapitation, nous avons réalisé une incision sur le sommet du crâne afin de dégager la voûte crânienne et de la prélever. Nous avons ensuite subi différentes digestions enzymatiques séquentielles à 37°C sous légère agitation pour les calvaria : La première digestion a été réalisée en présence de trypsine-EDTA 0.5g.L<sup>-1</sup> pendant 20 minutes à 37°C. Le surnageant contenant les impuretés a été jeté. Les os sont lavés deux fois avec du PBS stérile. Une deuxième digestion en présence de libérase 0.8 U.mL<sup>-1</sup> dans du milieu sans SVF a été effectuée pendant 20 minutes. Le surnageant a été filtré à l'aide de filtres 100µm sous la hôte puis centrifugé à 400 g pendant 8 minutes. Le culot, contenant les cellules est suspendu dans un milieu DMEM avec 15% SVF (v : v). Les os restant sont encore digérés par la libérase de même activité pendant 45 minutes à 37°C en agitation. Comme décrit plus haut, le surnageant a été filtré, centrifugé puis le culot est suspendu dans un milieu DMEM contenant 15% SVF. Le restant des os est lavé par un milieu sans SVF, pendant 30 minutes à 37°C sous agitation. Le surnageant est récupéré et traité selon les mêmes étapes. Toutes les cellules récupérées lors de ces étapes de digestion successives sont rassemblées dans un tube et comptées sur une cellule de Malassez. Nous avons obtenu approximativement 4 à 8 millions cellules à partir de 12 calvaria de souriceaux. Nous les avons ensemencées dans 500µl de milieu DMEM 15% SVF (v : v), à une densité de 100,000 cellules par puit sur une plaque de 12 puits. Après une journée d'incubation, nous avons lavé les cellules trois fois avec de PBS et les incubées dans un nouveau milieu de culture DMEM 15% SVF (v : v). Après trois jours de culture, nous avons ajouté 50µg.mL<sup>-1</sup> d'AA dans le milieu de DMEM 10% SVF (v : v). Les cellules sont incubées dans ce milieu jusqu'au jour dix. Au jour dix, nous avons rajouté 7.5mM de β-GP dans le milieu de culture contenant l'AA jusqu'au jour quinze. A ce stade, les cellules sont capables de minéraliser leur matrice et sont prêtes pour des analyses biochimiques.

#### *IV.2.3. Cellules musculaires lisses primaires*

##### Extraction des cellules musculaires lisses (CMLs) primaires de l'aorte du rat

Les rats de la variété Sprague Dawley sont tués dans une chambre à CO<sub>2</sub> ou décapités. Après l'extraction de l'aorte, nous avons enlevé les tissus connectifs et les couches de graisse.

Ensuite, nous l'avons coupée longitudinalement afin d'ôter l'endothélium. L'aorte est digérée dans une solution de collagénase A (à une dilution 1/20 dans un milieu de culture sans sérum) pendant une heure à 37°C sous agitation puis l'adventice (la couche la plus externe de l'aorte) est enlevée. Ensuite, nous avons coupé l'aorte en petits bouts, ces derniers sont maintenus dans un milieu DMEM (4.5 g.L<sup>-1</sup> de glucose), 10% (v: v) SVF, 200mM Gln pendant deux semaines afin de libérer toutes les CMLs et ensuite éliminer les bouts de l'aorte.

#### *IV.2.4. Modèle ex-vivo : L'aorte*

Les rats utilisés âgés de 42 jours sont les mêmes que ceux utilisés pour l'extraction des CMLs primaires. Nous avons récupéré l'aorte entière (aorte ascendante, crosse aortique, aorte descendante) en éliminant les tissus adipeux et connectifs. Nous l'avons infusée deux à trois fois par du PBS pour éliminer le sang. Nous avons éliminé l'adventice et l'aorte est ensuite utilisée pour la culture. Pour induire la calcification, nous l'avons traitée par 5mM de phosphate inorganique pendant 6 jours.

### **IV.3. Passage des cellules (Saos-2 et CMLs)**

L'ajout d'une solution contenant 0.25% de trypsine et de 0.03% de l'acide tétraacétique diamine éthylène (EDTA) dans le milieu de culture à 37°C permet de détacher les cellules. Une observation au microscope permet de vérifier que les cellules se sont bien décollées. Nous avons pu alors récupérer les cellules et nous avons effectué une centrifugation à 125g à la température ambiante pendant 7 minutes. Nous avons repris le culot cellulaire dans du milieu complet et ensemencé les cellules dans des flacons de culture.

### **IV.4. Différenciation des cellules**

Le milieu de différenciation que nous avons utilisé pour les Saos-2 et les ostéoblastes primaires est composé de 50µg.ml<sup>-1</sup> d'AA et 7.5mM de β-GP. Alors que celui pour les CMLs du rat, il est composé de 50µg.ml<sup>-1</sup> de l'AA et 5mM de Pi. Nous avons traité et laissé les cellules en culture pendant le temps nécessaire comme indiqué dans chaque expérience.

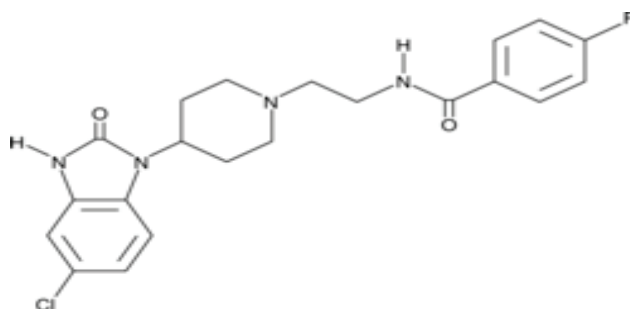
### **IV.5. Traitements**

#### *IV.5.1. Inhibiteurs des PLDs*

##### *IV.5.1.1. Halopemide*

L'halopemide (C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>ClFN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>): N-[2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidiny]-ethyl]-4-fluoro-benzamide, est un inhibiteur potentiel commun pour les

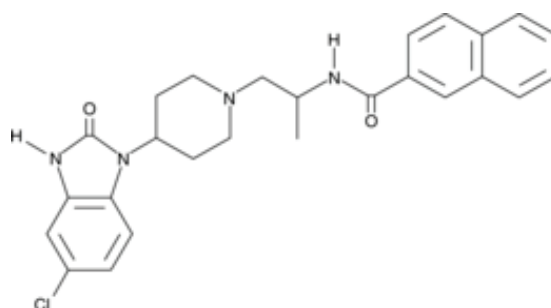
deux isoformes de PLD humain *in vitro* : PLD1 ( $IC_{50}=220\text{nM}$ ) et PLD2 ( $IC_{50}=310\text{nM}$ ).  $IC_{50}$  est la concentration de la substance active nécessaire pour inhiber 50% de la cible [267]. (Fig.16)



**Figure 16** : Structure chimique de l'halopemide

#### IV.5.1.2. CAY10593

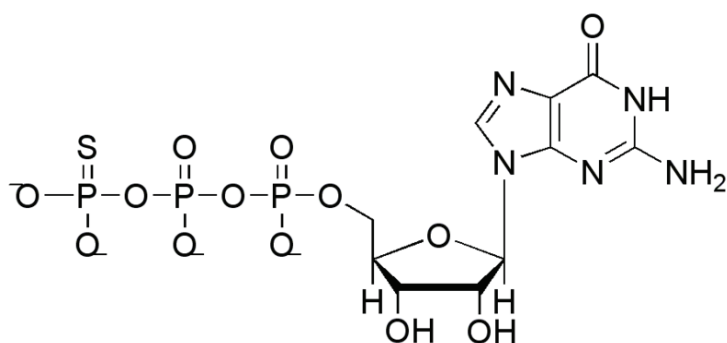
CAY10593 ( $C_{26}H_{27}ClN_4O_2$ ) : N-[2-[4-(5-chloro-2,3-dihydro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-yl)-1-piperidiny]-1-methylethyl]-2-naphthalenecarboxamide, est un inhibiteur puissant et sélectif de la PLD1, à la fois *in vitro* ( $IC_{50} = 46 \text{ nM}$ ) et dans les cellules ( $IC_{50} = 11 \text{ nM}$ ). Il est également efficace en tant qu'inhibiteur de la PLD2 à des concentrations plus élevées ( $IC_{50} = 933 \text{ nM in vitro}$ ;  $1800 \text{ nM}$  dans les cellules [267]. (Fig.17)



**Figure 17** : Structure chimique de CAY10593

#### IV.5.2. Activateur de protéines G: Guanosine triphosphate gamma S (GTP $\gamma$ S)

GTP $\gamma$ S ( $C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3S$ ) est couramment utilisé pour activer de façon stable les protéines G. Il est connu comme perméable aux cellules, non toxique et non hydrolysable. Dans le GTP $\gamma$ S, l'atome de soufre remplace l'oxygène lié au groupe phosphate à la position  $\gamma$ . (Fig.18)



**Figure 18 :** Structure chimique de  $GTP\gamma S$

La durée de l'activation d'une protéine G est contrôlée par la sous unité  $\alpha$ . La sous unité  $\alpha$  a une activité GTPase intrinsèque qui hydrolyse le GTP. Lorsque le GTP est hydrolysé en GDP la sous unité  $\alpha$  se réassocie aux sous unités  $\beta$  et  $\gamma$ . L'utilisation du  $GTP\gamma S$  permet de conserver la protéine G sous sa forme active car le  $GTP\gamma S$  reste fixé à la sous unité  $\alpha$  et donc l'empêche de se réassocier aux sous unités  $\beta$  et  $\gamma$ .

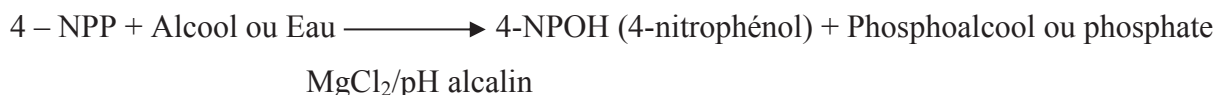
#### IV.6. Marquage par l'alizarine rouge

L'Alizarine rouge (AR-S) colore en rouge les dépôts calciques mettant en évidence la minéralisation. Les cellules en culture sont rincées avec du PBS sans calcium ni magnésium à un pH =7. Nous avons incubé les cellules pendant 30 minutes à la température ambiante avec 0,5% (m: v) d'AR-S diluée dans l'eau (g : ml), puis nous les avons lavées quatre fois avec de l'eau déminéralisée. Nous les avons observées ensuite en microscopie en contraste de phase pour effectuer une comparaison visuelle des échantillons. Ensuite, nous les avons incubées dans une solution de chlorure de cétylpyridinium (CPC) 3.6% (m : v) diluée dans l'eau pendant 2h pour les cellules Saos-2 ou pendant toute la nuit pour les ostéoblastes primaires à la température ambiante. L'absorbance s'est mesuré à 562nm. Nous avons effectué une gamme étalon avec des quantités définies d'AR-S dans la solution 3.6% (m : v) CPC pour évaluer la quantité d'AR-S qui s'est fixée. Nous avons fixé les aortes pendant 24-30 heures dans l'éthanol 95% (v : v) puis coloré avec l'AR-S 0.003% (m : v) préparé dans la solution aqueuse KOH 1% (m : v). Nous avons, ensuite, lavé les aortes avec une solution aqueuse de KOH 2% trois fois puis nous les avons photographiées.

#### IV.7. Dosage de l'activité de phosphatase alcaline tissue non spécifique TNAP

Cette méthode utilise du 4-nitrophénylphosphate (4-NPP) comme substrat. La TNAP présente dans l'échantillon catalyse la réaction d'hydrolyse du 4-NPP incolore soit en absence ou en présence d'un alcool de 2-amino 2-méthyl-1-propanol (AMPol).

#### *TNAP*



La réaction est suivie en mesurant le taux d'augmentation de l'absorbance à 405 nm correspondant au phénolate coloré en jaune qui est proportionnelle à l'activité de TNAP ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Nous avons prélevé un aliquot de 1  $\mu\text{L}$  (Saos-2 ou ostéoblastes primaires) ou 100  $\mu\text{L}$  (CMLs ou aortes) et nous l'avons déposé dans une cuvette contenant 1 mL de solution 10 mM 4-NPP, 0.56 M AMPol pH 10.3, 1mM  $\text{MgCl}_2$ .

#### **IV.8. Dosage des protéines (méthode BCA Pierce)**

Ce dosage est utilisé lorsque la solution protéique à doser contient des éléments (sels, détergents...) pouvant interférer avec le dosage par la méthode classique de Bradford. En solution alcaline, les protéines réduisent le  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ . Le réactif protéique acide bicinchoninique (BCA) réagit avec ce dernier en donnant un complexe  $\text{BCA-Cu}^+$  pourpre dosable au spectrophotomètre à 562 nm. Deux réactifs sont utilisés : Le réactif A contenant le carbonate de sodium, le bicarbonate de sodium, BCA et le tartrate de sodium dans l'hydroxyde de sodium NaOH 0.1N, et le réactif B contenant le  $\text{CuSO}_4$  4%. Nous avons prélevé un  $\mu\text{L}$  d'échantillon et nous l'avons complétés à 50  $\mu\text{L}$  par le nonidet P40 0.2% (v : v), et ensuite nous avons rajouté un mL de réactif contenant la solution A et la solution B avec un rapport (v : v) cinquante A : un B. Nous avons incubé le mélange pendant 30 minutes à 60° C, puis l'absorbance est mesurée à 562 nm. Parallèlement, nous avons effectué une gamme étalon de 0 à 20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  de protéines à partir d'une solution standard de BSA.

#### **IV.9. Transfection transitoire des cellules Saos-2 par la lipofectamine LTX**

La transfection est réalisée en présence de la lipofectamine avec les vecteurs pEGFP, pEGFP-hPLD1 ou pEGFP-hPLD2. Les plasmides pCDNA3 contenant la séquence complète codante pour hPLD1b et hPLD2 ont servi de matrice pour l'amplification des séquences d'ADN de PLD1 et PLD2 par PCR. Ces séquences une fois amplifiées et purifiées sont insérées dans les plasmides pEGFP-C1. La lipofectamine est une macromolécule hautement chargée positivement qui forme un polymère en réseau qui emprisonne l'ADN. Le complexe ainsi formé entre dans la cellule par endocytose et relâche l'ADN dans le cytoplasme. Nous avons ajouté 1  $\mu\text{g}$  d'ADN plasmidique pour 0.75  $\mu\text{g}$  de Lipofectamine LTX dans 200  $\mu\text{L}$  de milieu cellulaire McCoy's sans SVF. Nous avons incubé l'ensemble Lipofectamine/ADN plasmidique trente minutes à la température ambiante. Puis, nous avons incubé le complexe



lipofectamine/ADN plasmidique dans un mL de milieu de culture McCoy's contenant  $500.10^3$  cellules que nous avons ensemencées 24h avant. La durée d'incubation de la transfection est de 48 heures à 37°C puis nous les avons visualisées sous un microscope à fluorescence.

#### **IV.10. Immuno détection Western Blotting**

Les électrophorèses sont réalisées sur un gel de polyacrylamide à 8% (v : v) en conditions dénaturantes dans une solution aqueuse en présence de 0,1% de SDS (m : v) (g : ml) et 4 M d'urée grâce à un appareil d'électrophorèse pour minigels. La migration électrophorétique s'est effectuée à 120V à voltage constant. La migration est calibrée grâce aux dépôts de marqueurs moléculaires colorés dans un puit de référence. Le transfert du gel électrophorèse vers le support permettant l'immunodétection se fait dans un tampon de transfert (25mM de TrisHCl, pH=8,3, 0,19 M de glycine, 20% (v : v) de méthanol) en appliquant un courant électrique de 100 mA pendant 2h. Les marqueurs de masse moléculaire sont également transférés et peuvent servir de contrôle. A la fin du transfert, nous avons lavé la membrane avec un tampon Tris salin Tween20 (TBS-T) (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137 mM, pH=7.6, Tween 20 à 0,1% (v : v)), puis nous avons saturé la membrane dans un bain TBS-T avec du lait 10% (m : v) (g : ml) pendant 2 heures puis rincé cinq fois par le TBS-T. Puis nous l'avons incubée à 4°C pendant toute la nuit avec un anticorps primaire. Elle est ensuite rincée cinq fois par le TBS-T à la température ambiante puis incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase du Raifort pendant une heure. La membrane est à nouveau lavée abondamment et la révélation des protéines immuno détectées se fait grâce à l'activité de la peroxydase qui catalyse une réaction de chimioluminescence en présence d'eau oxygénée et du luminol. Les rayonnements produits par la réaction sont amplifiés chimiquement par les phénols (kit ECL). Nous avons révélé les membranes sur film d'autoradiographie. Nous avons quantifié les bandes par vidéodensitométrie et les résultats sont exprimés en unité arbitraire après normalisation avec la tubuline.

**Conditions spécifiques à chaque protéine détectée :** 1) Dans le cas de tubuline, l'anticorps monoclonal anti-tubuline est dilué d'un facteur de 1/2000 dans du TBST-BSA 0,1% (m : v) (g : ml) tandis que l'anticorps secondaire anti-IgG de souris est dilué de 1/2000 fois dans du TBST 0.1% (v : v). 2) Dans le cas de la PLD, nous avons préparé un gel de 8% (v : v) de polyacrylamide, dans une solution aqueuse contenant 0,1% (m : v) de SDS et 4 M d'urée. Les deux isoformes de PLD sont détectées grâce à un anticorps anti-PLD1 (dilution de 1/500 dans BSA 0.1% (m : v)) ou anti-PLD2 (dilution de 1/2000 dans BSA 0.1% (m : v)). L'anticorps secondaire anti-lapin est ensuite utilisé (dilution de 1/2000 dans TBST).

## IV.11. RT-QPCR

### *IV.11.1. Extraction des acides ribonucléiques*

Nous avons homogénéisés les échantillons dans 1 mL de trizol et centrifugés à 12000g pendant 10 minutes. Nous avons ajouté 200µL de chloroforme sur le surnageant récupéré, puis réalisé un vortex pendant 15 secondes. Le mélange est mis au repos à la température ambiante pendant 10 minutes et ensuite nous l'avons centrifugé à 12000g pendant 15 min à 4°C. Nous avons obtenu trois phases: une phase incolore enrichie en acides ribonucléiques (ARN), une interphase contenant de l'Acide désoxyribonucléique (ADN) ainsi qu'une phase organique rouge enrichie en protéines. Nous avons récupéré la phase aqueuse contenant l'ARN et précipité l'ARN avec 500 µL d'isopropanol. Après incubation à la température ambiante pendant 5-10 minutes, nous avons réalisé une centrifugation à 12000g pendant 10 minutes à 4°C. Après l'élimination du surnageant, nous avons lavé le culot avec de l'éthanol 75% (v : v) et centrifugé ensuite à 7500g à 4°C. Le culot est séché à température ambiante et solubilisé dans l'eau sans ARNase ni DNase. La concentration d'ARN est mesurée à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop.

### *IV.11.2. Transcription inverse*

Cette réaction se fait selon le protocole suivant : L'ARN dilué dans l'eau est dénaturé à 75°C pendant 5 min. Il est mélangé avec l'enzyme transcriptase inverse maintenue dans son tampon, des hexamères désordonnés (0.1µM), des dNTPs (2mM) et des DTTs (0.2mM). Ensuite le mélange est incubé pendant 10 min à la température ambiante avant de le mettre dans le thermocycleur. La réaction s'est faite à 42°C pendant 30min et elle est inactivée par chauffage à 99°C pendant 5 min.

### *IV.11.3. Réaction de polymérisation en chaine quantitative QPCR*

La PCR quantitative en temps réel repose sur la possibilité de suivre au cours du temps le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le  $C_p$  et apparaît en début de phase exponentielle. Ce concept de  $C_p$  est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique. La fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel permet d'observer le nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes. 1) Une **Phase de « bruit de fond »** correspondant à une quantité de

fragment amplifié insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée). 2) Une **Phase exponentielle** correspondant à la quantité de fragment amplifié qui génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil. Le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite. 3) Une **Phase plateau** (ou de saturation) dont certains composants de la réaction deviennent limitant. Le système ne permet plus une amplification exponentielle. Des sondes fluorescentes se fixent sur l'ADN double brin (technologie SYBR). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN (à cause d'un effet atténuant). Nous avons effectué les QPCR à l'aide d'un mélange commercial contenant les réactifs nécessaires «*SYBR Green, BioRad* » sur des ARN totaux isolés à partir des Saos-2, des CMLs et des aortes en utilisant des amorces sens et anti-sens spécifiques à nos gènes. (Tableau 2)

**Tableau 2 :** *Amorces permettant l'amplification des gènes spécifiques.*

Gènes	Amorces sens 5'-----3'	Amorces anti-sens 5'-----3'
<b>hPLD1</b>	TGTCGTGATACCACTTCTGCCA	AGCATTTTCGAGCTGCTGTTGAA
<b>hPLD2</b>	CATCCAGGCCATTCTGCAC	GTGCTTCCGCAGACTCAAGG
<b>hEP2</b>	ACCTCATCCGCATGCACCGC	AGGTGGTCCGTCTCCTCCGC
<b>hEP3</b>	TGCTTCATCAGCACCGGGCG	GTCAGCGCCAAGAGCCCCAG
<b>hEP4</b>	AAGCGATTGGCGGGCCTCAC	TCTGGGTACTGCAGCCGCGA
<b>rOPN</b>	TGAGACTGGCAGTGGTTTGC	CCACTTTCACCGGGAGACA
<b>rRUNX2</b>	GCTTTGGCTACTCTCCAGCA	AGCTGTGCCGTCCATACTTT
<b>hActine</b>	TCCTAGCACCATGAAGATCAAG	GACTCATCGTACTCCTGCTTG
<b>rRPLP0</b>	ACTCGCTTCCTAGAGGGTGT	GACTTGGTGTGAAAAGCTTA
<b>hGAPDH</b>	GTTCCAATATGATTCCACCC	AGGGATGATGTTCTGGAGAG

#### IV.12. Détection par fluorescence du cytosquelette d'actine

Nous avons fixé les cellules par le paraformaldéhyde à 3,7% (v : v) dans du PBS pendant 20 minutes à température ambiante. Ensuite, nous les avons lavées deux fois avec de PBS et perméabilisées à l'aide d'une solution de 0.1% (v : v) de triton 100X pendant 15 min à la température ambiante. Après avoir lavé avec le PBS deux fois, nous les avons incubées en présence de BSA 1% (m : v) (g : ml) pendant 20 minutes. Nous avons marqué les cytosquelettes d'actine, à l'abri de la lumière avec de la phalloïdine conjuguée à la rhodamine (dilution 1/200 dans du PBS) pendant 20 minutes, lavé trois fois avec du PBS et effectué le co-marquage des noyaux avec le DAPI (dilution 1/10000 dans du PBS) pendant 10 minutes.

Enfin, nous avons visualisé les cellules sous un microscope à fluorescence après trois lavages successifs avec du PBS.

#### **IV.13. Dosage de l'activité totale des phospholipases D**

Nous avons utilisé la propriété d'hydrolyse de la phosphatidylcholine par la PLD en formant la choline et le PA. Nous avons récolté les cellules dans 500µl de tampon Tris-HCl (pH 8), en présence d'inhibiteurs de protéases, puis nous les avons lysées par congélation dans l'azote liquide et décongélation à 37°C trois fois. Ensuite, nous avons incubé les échantillons avec 0.5 mM de phosphatidylcholine et 1 mM de levamisole à 37°C pendant 15 minutes dans le cas des cellules Saos-2 et des ostéoblastes primaires ou pendant 30 minutes dans le cas des aortes. La choline a été dosée à l'aide du réactif « Amplex red ». Le milieu contient deux enzymes la peroxydase de raifort (HRP) 2 U.mL<sup>-1</sup> et la choline oxydase (CO) 0.2 U.mL<sup>-1</sup> ainsi que 100µM du réactif « Amplex Red » dans le tampon de réaction : Tris-HCl 0.25M et 25mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8. Nous avons mesuré la fluorescence sous une longueur d'onde d'excitation 530 nm et celle d'émission 590 nm en utilisant le lecteur de plaque (96 puits). Nous avons normalisé la fluorescence par la concentration protéique.

#### **IV.14. Immunoprécipitation (Kit PureProteome™ sur billes magnétiques)**

Nous avons récolté les cellules dans 400 µl de tampon de lyse 20mM Tris contenant 100mM NaCl, 10mM pyrophosphate, 10mM glycérophosphate, 50mM Naf, 1% (m : v), Triton et 0.1% (v : v) inhibiteurs de protéases, pH 7.6. Nous avons lysé les cellules par sonication trois fois à froid. Nous avons incubé 300µl de l'homogénat toute la nuit à 4°C avec 2µl de l'anticorps polyclonal anti-PLD1 sous agitation. Dans un tube eppendorf, nous avons lavé 50µl de suspension de billes magnétiques, contenant des protéines G liées d'une manière covalente, dans 500µl de PBS contenant 0.1% Tween (m : v). Ensuite nous avons mis ces tubes dans un portoir magnétique pour faire adhérer les billes et ainsi aspiré le tampon de lavage. Nous avons mélangé les billes lavées avec l'homogénat contenant le complexe antigène-anticorps (PLD1-IgG1) puis nous les avons incubées pendant 30 minutes sous agitation à 4°C. Au cours de cette incubation, les antigène-anticorps (PLD1-IgG1) forment un complexe stable avec des protéines G attachées aux billes. Par la suite, nous avons conservé le milieu sans les billes comme contrôle pour normaliser la quantité de protéines dans les échantillons. Nous avons choisi la tubuline comme protéine marqueur car elle est présente d'une manière stable dans les cellules. La tubuline est détectée par western Blot en parallèle sur un gel classique 10% (v : v). Nous avons lavé les billes ensuite avec du PBS-Tween 0.1%

(v : v). 50µl de tampon d'élution (formé d'un volume de tampon de lyse et d'un volume de tampon laemli concentré 2 fois) sont ajoutés. Nous avons chauffé le milieu contenant les billes enrichies en PLD1 à 100°C pendant deux minutes puis le surnageant contenant la PLD1 est prélevé après avoir placé les billes à adhérer grâce au portoir magnétique. Le surnageant est prêt à être déposé sur un gel polyacrylamide 8% contenant de l'urée à 4 M.

#### **IV.15. Analyse statistique**

Au titre de comparaison statistique, le test a été fait en utilisant le logiciel SigmaStat3. Les valeurs de  $P < 0.05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

# **CHAPITRE V**

## **RÉSULTATS**

## **Partie A : La phospholipase D1 est impliquée dans le processus de la minéralisation physiologique.**

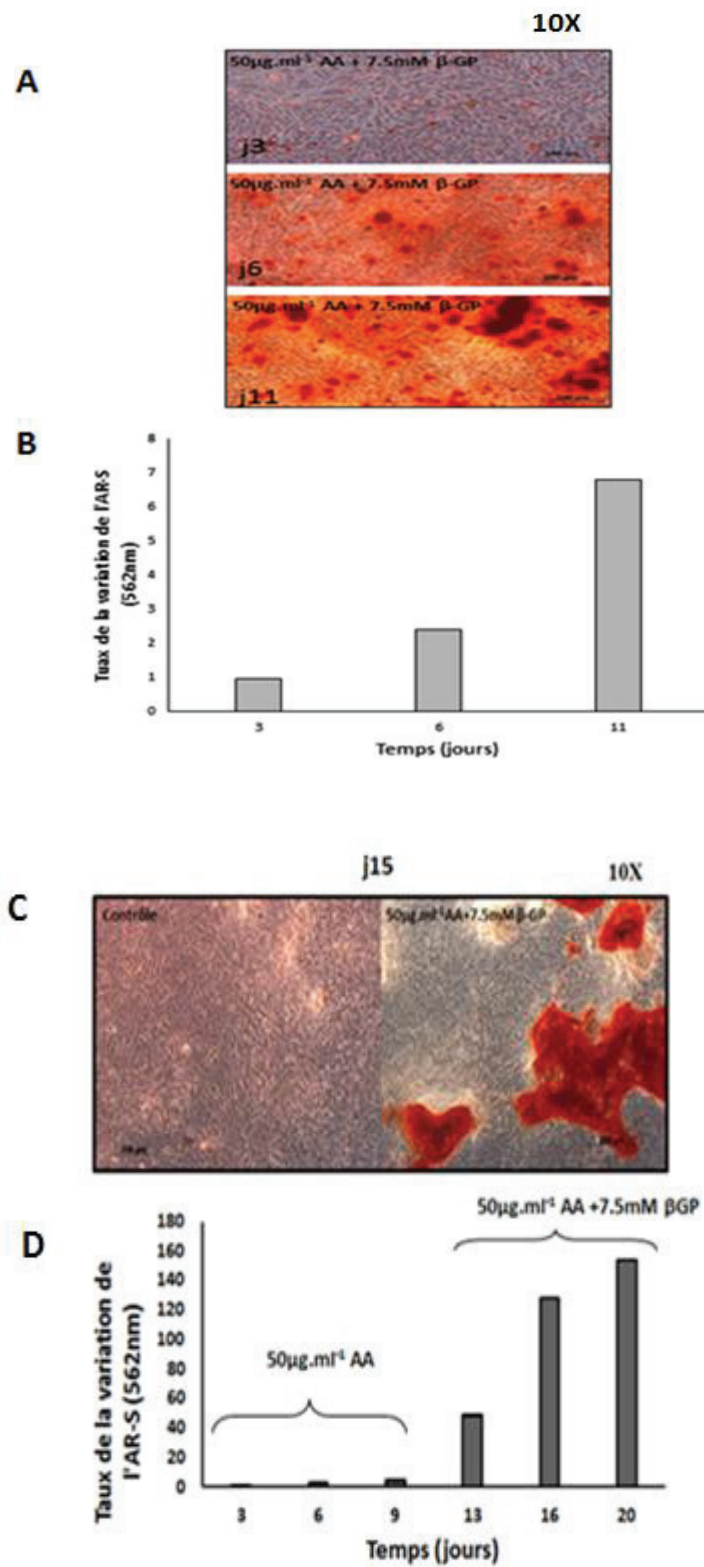
Nous voulons déterminer à quel moment et quels types de la PLD sont exprimés pendant le processus de la minéralisation physiologique. Nous suspectons qu'une PLD agit au cours de la minéralisation car notre laboratoire a détecté une activité de la phospholipase D dans les VMs qui initient la minéralisation dans la MEC [268].

Un de nos objectifs est de déterminer le rôle de la PLD dans la minéralisation induite par des cellules osseuses. Afin de suivre l'expression et l'activité de la PLD, nous avons utilisé une lignée cellulaire d'origine ostéosarcome humain (Saos-2) et des ostéoblastes primaires issus des calvaria de souris. Nous avons dans un premier temps caractérisé ces modèles cellulaires.

### **V.A.1. Caractérisation de la lignée humaine Saos-2, mimant les ostéoblastes, et des ostéoblastes primaires issus de calvaria de souris.**

#### ***V.A.1.1. Dosage des minéraux par coloration à l'alizarine rouge***

Les cellules sont stimulées dans un milieu ostéogénique contenant 7.5 mM de  $\beta$ -glycérophosphate ( $\beta$ -GP) et 50  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  d'acide ascorbique (AA). L'AA induit la production de collagène de la matrice extracellulaire de l'os. Le  $\beta$ -GP est hydrolysé par la TNAP en produisant du phosphate inorganique [269]. L'effet de ce traitement sur la minéralisation a été mis en évidence par la coloration à l'AR-S, quantifié par CPC 3.6% (m: v) et dosé au spectrophotomètre à 562nm. Nous avons remarqué que les cellules Saos-2 commencent à minéraliser dès le 6<sup>ème</sup> jour de stimulation (Fig.19 A et B) et les ostéoblastes primaires dès le 3<sup>ème</sup> jour après ajout du  $\beta$ -GP 7.5mM (Fig.19 C et D). La minéralisation augmente au cours du temps favorisant donc la formation de cristaux. Les cellules sont capables de minéraliser leur matrice.

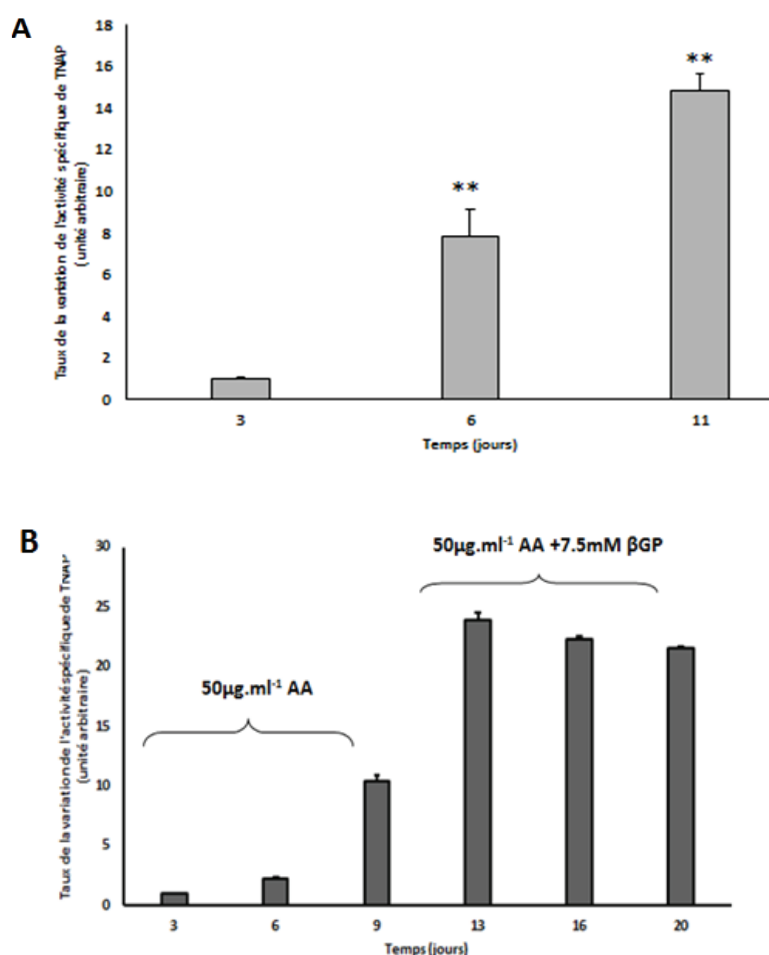


**Figure 19:** Observation microscopique et *quantification des minéraux dans les cellules Saos-2 (A et B) et les ostéoblastes primaires(C et D) stimulées par AA et β-GP au cours du temps.*



### V.A.1.2. Dosage de l'activité spécifique de la phosphatase alcaline tissu non spécifique

Nous avons dosé au cours du temps l'activité de la TNAP (un marqueur de la minéralisation) dans les cellules Saos-2 et les ostéoblastes primaires traités par 7.5mM  $\beta$ -GP et 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  AA. Parallèlement à la formation des minéraux (Fig.19), nous avons observé une augmentation de l'activité de TNAP à partir du 6<sup>ème</sup> jour de traitement avec AA et  $\beta$ -GP et au cours du temps pour les cellules Saos-2 (Fig.20A) et à partir du 9<sup>ème</sup> jour en présence d'AA pour les ostéoblastes primaires. (Fig.20B) Cette activité augmente au cours du temps, de façon importante au 13<sup>ème</sup> jour de traitement (3 jours après ajout de 7.5mM  $\beta$ -GP) dans les ostéoblastes primaires. (Fig.20B) La TNAP, en hydrolysant des phosphomonoesters et également le pyrophosphate (PPi), un inhibiteur de minéralisation, favorise la formation d'hydroxyapatite. Ce résultat confirme que les Saos-2 et les ostéoblastes primaires sont des cellules capables de minéraliser leur MEC.



**Figure 20 :** Mesure de l'activité spécifique de TNAP dans les cellules Saos-2(A) et les ostéoblastes primaires(B) : L'activité de TNAP est dosée en ajoutant le réactif pNPP (10mM) dans le milieu contenant AMP (0.56 M) et  $\text{MgCl}_2$  (1mM). Suite à cette hydrolyse, la formation de nitrophénol est dosée au spectrophotomètre à  $\lambda=405 \text{ nm}$ .

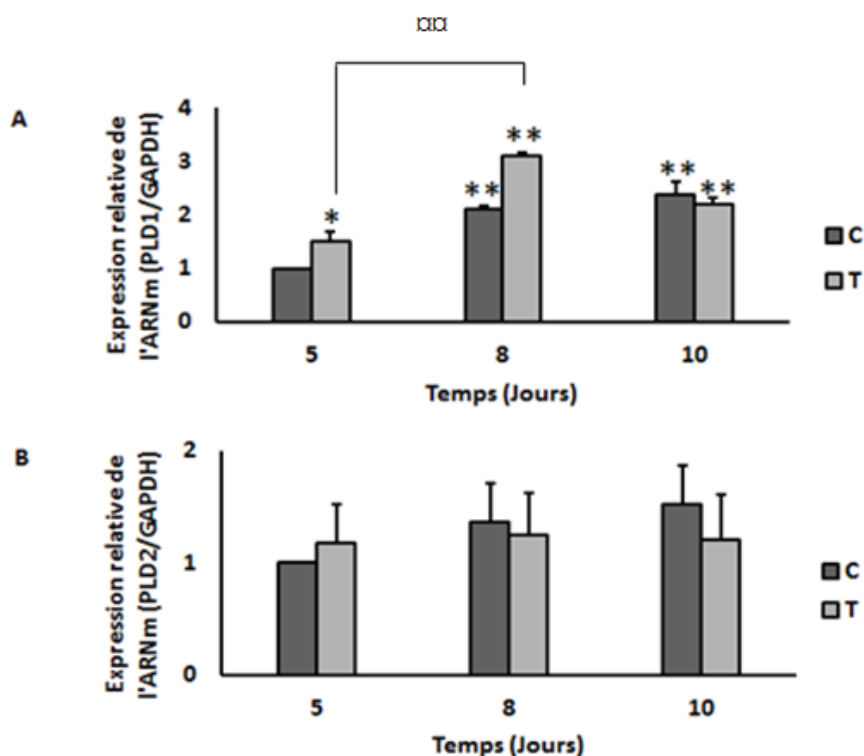
### **V.A.2. Le milieu ostéogénique induit une surexpression significative de la PLD1 au jour 5 de stimulation dans les cellules Saos-2.**

Nous avons vérifié le niveau d'expression des deux isoformes de la PLD : PLD1 et PLD2, au cours de la stimulation des cellules Saos-2 par RTQPCR et par Western Blot.

#### ***V.A.2.1. Expression génomique***

Nous avons déterminé le niveau d'expression des deux isoformes de la PLD par RTQPCR à l'aide des amorces spécifiques pour PLD1 et pour PLD2 et en normalisant avec GAPDH. Nous avons remarqué une surexpression significative de la PLD1 au 5<sup>ème</sup> jour de traitement avec  $\beta$ -GP et AA comparé au contrôle non traité. Cette surexpression reste toujours significative jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour puis elle se stabilise. Les cellules contrôles et stimulées au 8<sup>ème</sup> jour montrent aussi une surexpression de la PLD1 par rapport à celles non stimulées et stimulées respectivement au 5<sup>ème</sup> jour. (Fig.21A) Les cellules non stimulées sont capables de minéraliser au 5<sup>ème</sup> jour mais dans une moindre mesure que les cellules stimulées.

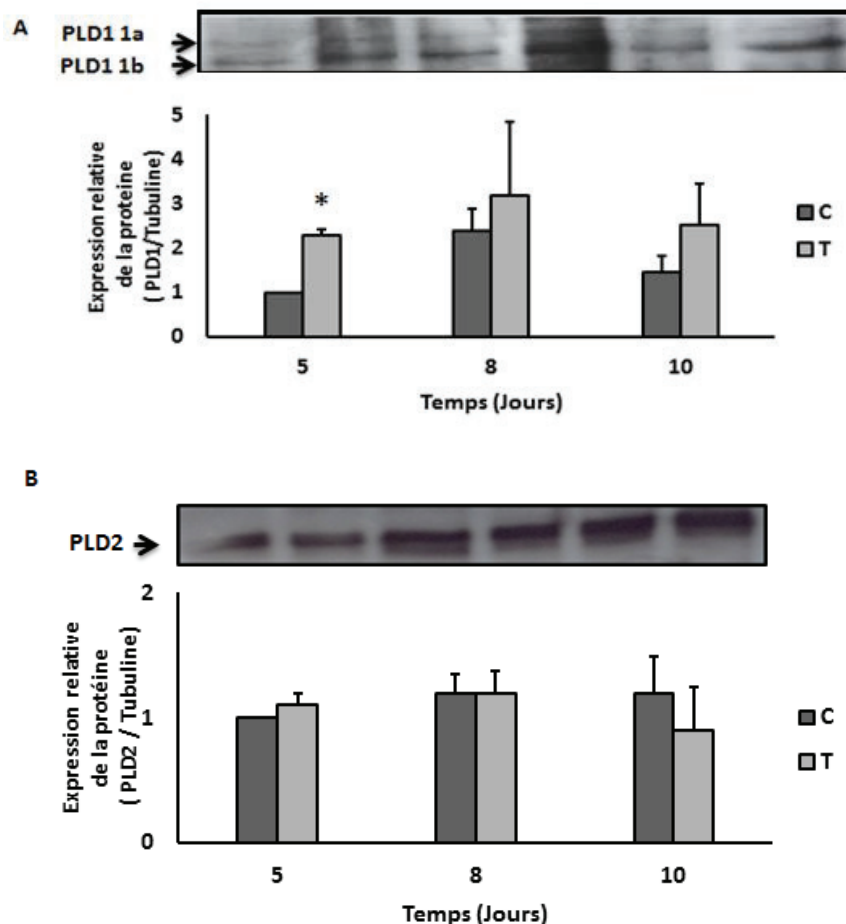
Ces résultats indiquent que l'expression de la PLD1 augmente au cours de la maturation des cellules. Par contre, il n'y a pas de variation significative de l'expression de la PLD2 au cours de la différenciation et minéralisation des cellules Saos-2 (Fig.21B).



**Figure 21 :** Expression génomique des isoformes de la PLD : PLD1 (A) et PLD2 (B) au cours de la différenciation des cellules Saos-2. Les cellules Saos-2 ont été mises en culture pendant plusieurs jours comme indiqués dans la figure dans un milieu ostéogénique contenant 7,5 mm  $\beta$ -GP et 50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> AA. L'expression de chaque gène a été évaluée par PCR quantitative en temps réel (QPCR). L'ARN total est extrait à partir des cellules Saos-2 et la normalisation est effectuée par rapport au niveau d'expression de GAPDH. (C: non stimulé, T: Stimulé). (\*, les résultats sont comparés au contrôle jour 5, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  et  $\square\square$ , les résultats sont comparés aux cellules stimulées jour 5,  $\square\square$  :  $P < 0.01$ ,  $n=3$ ).

#### V.A.2.2. Expression protéique

Parallèlement, nous avons suivi l'expression protéique par Western Blot en utilisant des anticorps spécifiques PLD1 (120 Kda) et PLD2 (100 Kda) et nous avons pu quantifier les bandes à l'aide du logiciel imageJ. Nous avons obtenu une surexpression significative de la protéine PLD1 au 5<sup>ème</sup> jour de stimulation par rapport au contrôle dans les cellules Saos-2, alors qu'il n'y a pas de variation significative dans les jours qui suivent. (Fig.22A) Ce qui est cohérent avec le niveau d'expression transcriptionnel de la PLD1 observé au 5<sup>ème</sup> jour. (Fig.21A) En accord avec le niveau d'expression transcriptionnel de la PLD2, il n'y a pas de variation significative au cours de temps pour l'expression protéique de la PLD2 selon les mêmes conditions de stimulation. (Fig.22B)



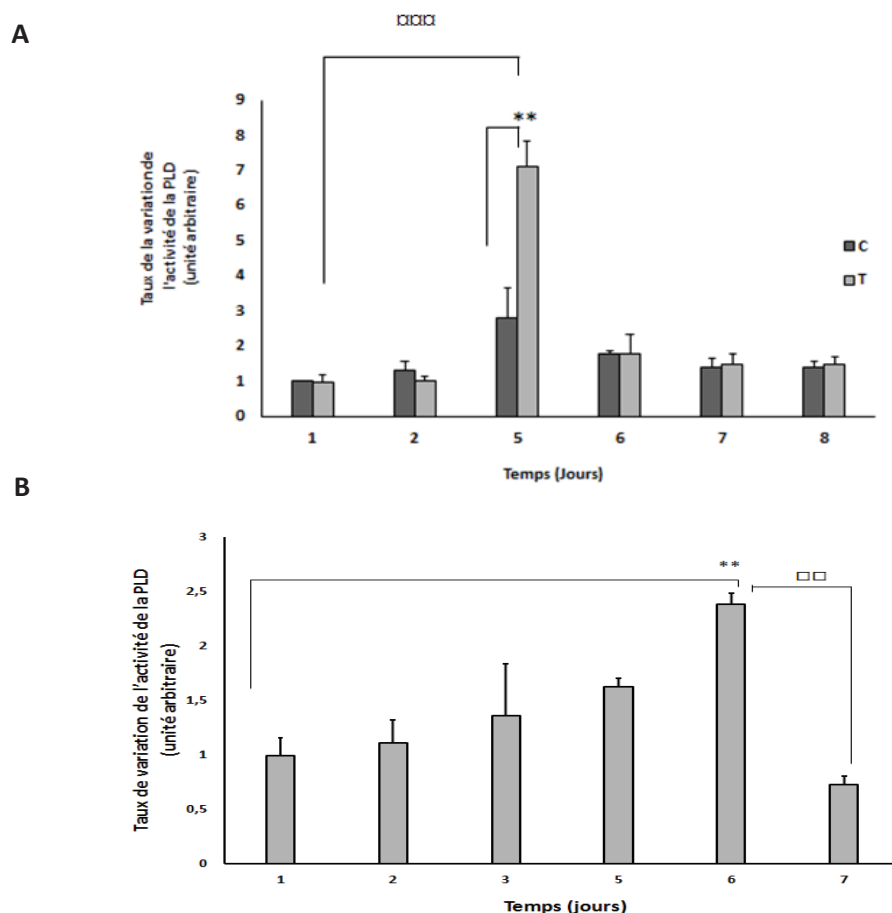
**Figure 22:** Expression protéique de la PLD1 (A) et la PLD2 (B) au cours de la différenciation des cellules Saos-2. (C: non stimulé, T: Stimulé). (\*, les résultats sont comparés aux cellules non stimulées au jour 5, \*:  $P < 0.05$ ,  $n=4$ ).

Donc les deux isoformes (PLD1 et PLD2) sont exprimées dans les cellules Saos-2. Nous avons obtenu une surexpression significative de la PLD1, et non celle de la PLD2, au niveau de l'ARNm et de la protéine au jour 5 de stimulation. Ces résultats confirment que la PLD1 pourrait intervenir pendant le processus de la minéralisation.

### V.A.3. Le milieu ostéogénique entraîne une augmentation significative de l'activité de la phospholipase D dans les cellules Saos-2 et les ostéoblastes primaires.

Nous avons mesuré l'activité de la PLD globale en dosant la choline par fluorescence. Nous avons observé une augmentation significative de l'activité de la PLD de l'ordre de 2.5 fois au jour 5 dans les cellules Saos-2 stimulées par rapport aux cellules non stimulées, mais de 7 fois par rapport au premier jour de stimulation. Cette activité PLD a diminué pour atteindre un niveau d'activité basal. (Fig.23A) Pour les ostéoblastes primaires, l'activité a augmenté

significativement au 6<sup>ème</sup> jour de traitement avec de l'AA et  $\beta$ -GP puis elle diminue au 7<sup>ème</sup> jour. (Fig.23B)



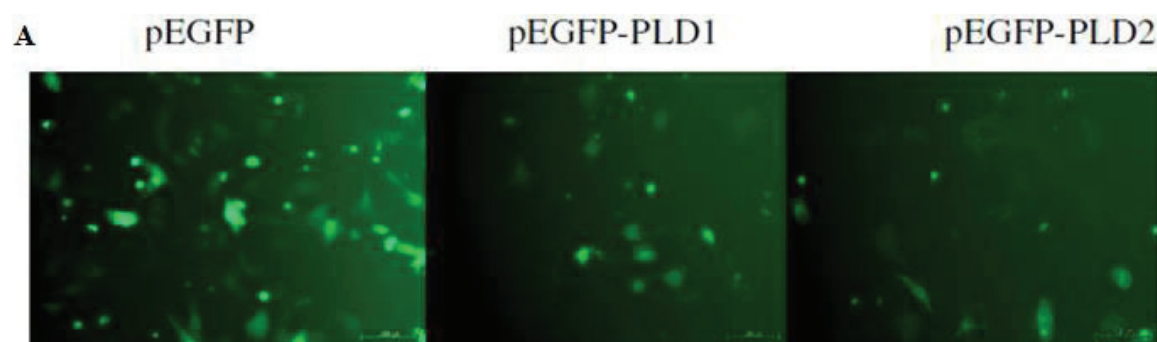
**Figure 23:** Mesure de l'activité de la PLD au cours du temps dans les cellules Saos-2 en présence ou non de l'AA et  $\beta$ GP(A) et les ostéoblastes primaires en présence uniquement de l'AA et  $\beta$ GP (B). Le jour 1 correspond à 24h00 d'incubation des cellules en présence à la fois de  $\beta$ GP 7.5mM et d'AA 50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. L'activité de la PLD obtenue pour chaque essai est normalisée avec l'activité basale contrôle obtenue au jour1. Pour les Saos-2 : \*, les résultats sont comparés aux cellules non stimulées au jour 5, \*\*: P<0.01, et □□□ : les résultats sont comparés aux cellules stimulées au jour1. □□□ <0.005, n=3). (C : non stimulé et T : Stimulé)(La valeur de l'activité de la PLD pour le contrôle jour1 est égale à 0.34 pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines). Pour les ostéoblastes primaires, \*\*: P<0.01, les résultats sont comparés aux cellules stimulées au jour1 et □□ : P<0.01 : les résultats sont comparés aux cellules stimulées au jour 6. La valeur de l'activité de la PLD pour le stimulé jour1 est égale à 0.36 pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de protéines.

L'augmentation de l'expression de la PLD1 est accompagnée par une augmentation de l'activité de la PLD dans les cellules Saos-2 au jour 5 de stimulation. De plus, nous avons observé une augmentation de l'activité de la PLD au cours du temps dans les ostéoblastes primaires stimulés par l'AA et le  $\beta$ GP. Elle augmente jusqu'au jour 6 et diminue pour arriver à un niveau basal (Fig.23B). Les Saos-2 commencent à minéraliser au jour 6 de stimulation (Fig.19A et 20A) et les ostéoblastes primaires au jour 4 après ajout de  $\beta$ GP (Fig.19B et 20B). Ceci suggère que la PLD intervient pendant le processus de minéralisation.

#### V.A.4. La surexpression de la PLD favorise la minéralisation dans les cellules Saos-2.

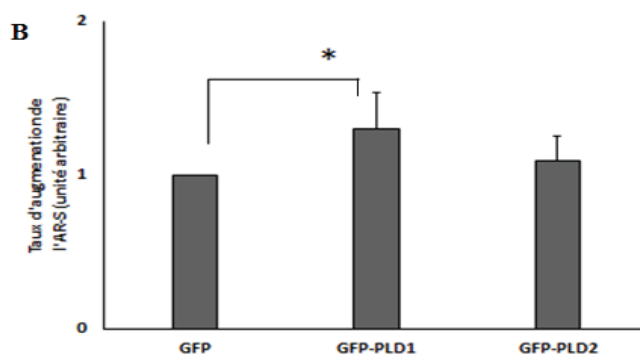
Afin de mettre en évidence l'action de la PLD pendant le processus de minéralisation, nous avons varié le niveau d'expression des deux isoformes de la PLD pour observer leurs effets respectifs sur la maturation des cellules Saos-2. Nous avons surexprimé chacune des deux isoformes de la PLD séparément et nous avons mesuré la formation des minéraux à l'aide du marquage AR-S et du dosage de l'activité TNAP. Pour chaque isoforme, une protéine fluorescente verte (EGFP) a été ajoutée afin de pouvoir suivre leur niveau d'expression dans la cellule au moyen de la microscopie de fluorescence. Les plasmides pEGFP (contrôle), pEGFP-PLD1 et pEGFP-PLD2 sont transfectés dans les cellules Saos-2.

Après 48h de transfection, nous avons visualisé les cellules transfectées sous un microscope à fluorescence et nous avons pu évaluer le taux de la transfection en comptant les cellules à fluorescence verte par rapport aux cellules totales: pour le plasmide pEGFP, il était de 50% ; pour pEGFP-PLD1 et pour pEGFP-PLD2, il était de 30%. (Fig.24A)



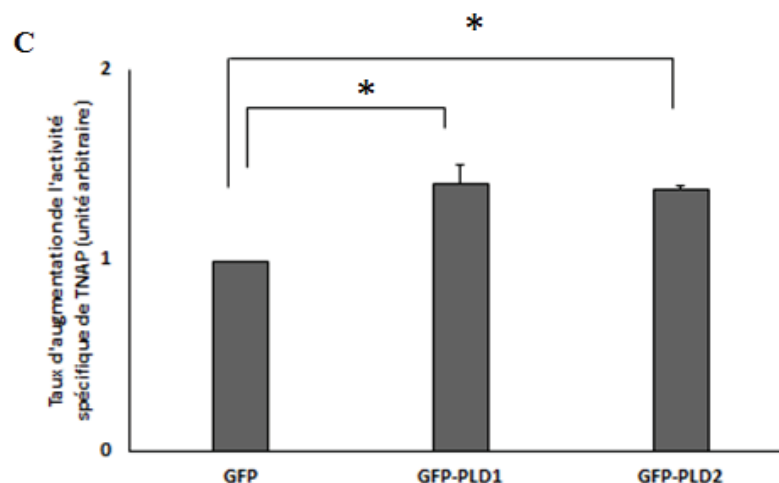
**Figure 24A:** Expression des protéines de fusion PLD-GFP dans les cellules Saos-2 : Les cellules en culture sont transfectées par les plasmides pEGFP, pEGFP-PLD1 et pEGFP-PLD2 respectivement, et observées au microscope à fluorescence 48h après transfection (objectif 10X).

Après 48 heures de transfection, nous avons stimulé les cellules pendant une semaine avec 7.5mM  $\beta$ -GP et 50 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> AA. Nous avons quantifié la formation des minéraux par coloration à l'AR-S 0.5% (m : v) à l'aide d'un spectrophotomètre. Nous avons ensuite quantifié les minéraux à l'aide d'un spectrophotomètre. Nous avons observé une augmentation significative de la coloration de l'AR-S, reflétant la formation des minéraux dans les cellules surexprimant GFP-PLD1 comparativement aux cellules surexprimant GFP et celles surexprimant GFP-PLD2. (Fig. 24B)



**Figure 24B:** Quantification des minéraux produits dans les cellules Saos-2 transfectées et stimulées pendant une semaine: Les valeurs d'absorbances sont normalisées par rapport aux cellules stimulées et transfectées par GFP. (\*, le résultat est comparé aux cellules transfectées par GFP et stimulées, \*:  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). (Concentration de l'AR-S pour les cellules transfectées et stimulées par GFP est de 1,5  $\mu$ M).

Nous avons dosé l'activité de TNAP dans les cellules Saos-2 transfectées et stimulées par 7.5mM  $\beta$ -GP et 50  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> AA. Nous avons observé, parallèlement au dosage de l'AR-S, une augmentation significative de l'activité spécifique de TNAP pour les cellules transfectées par GFP-PLD1 et celles transfectées par GFP-PLD2 comparativement aux cellules transfectées par GFP. L'augmentation de l'activité spécifique de TNAP pour les cellules transfectées par GFP-PLD2 est légèrement inférieure à celles transfectées par GFP-PLD1. (Fig. 24C)

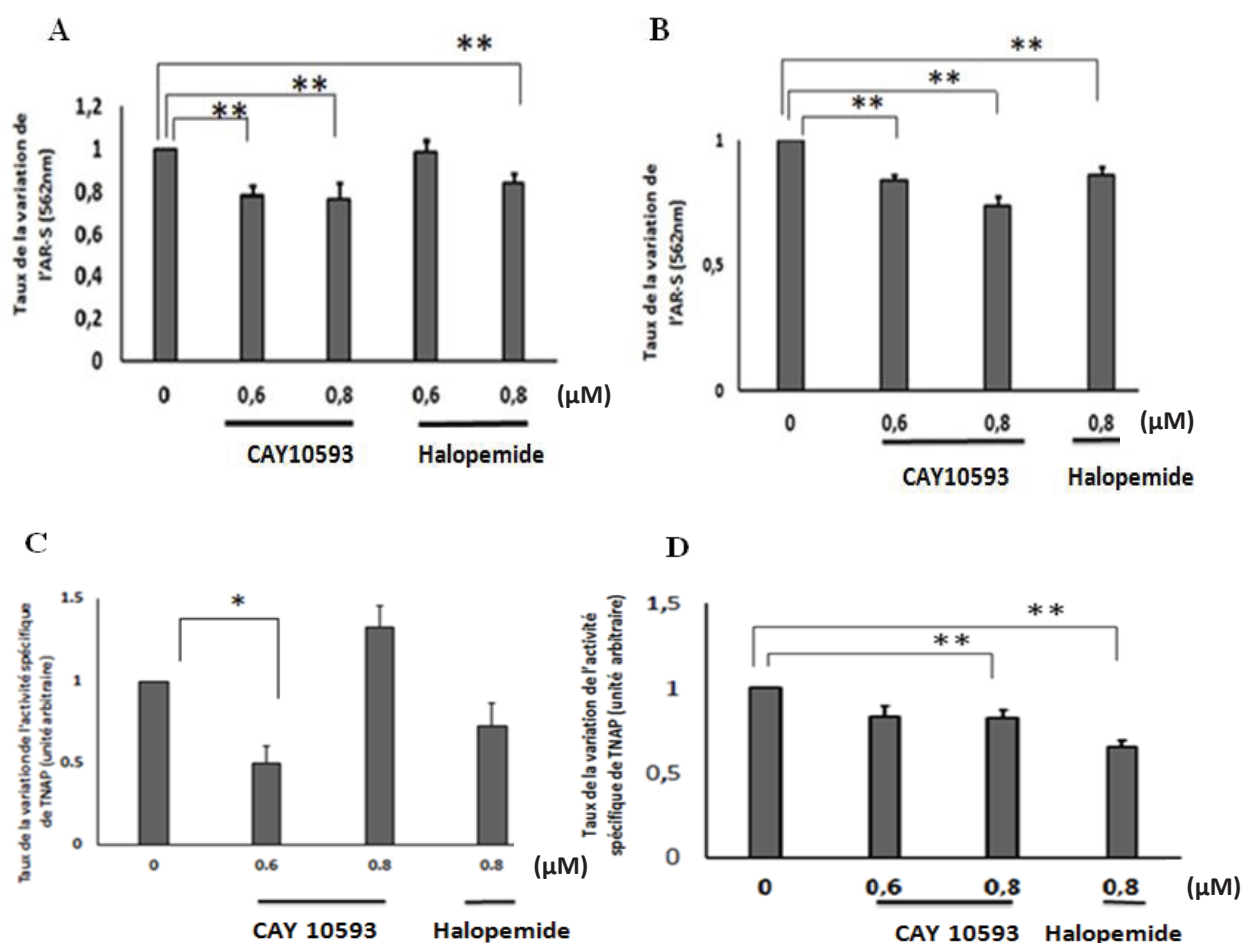


**Figure 24C:** Mesure de l'activité de TNAP dans les cellules Saos-2 transfectées et stimulées jusqu'au jour 8: L'hydrolyse de pNPP en Pi et en nitrophénol est dosée au spectrophotomètre à 405 nm. Cette activité est corrigée par la concentration protéique. (\*, les résultats sont comparés aux cellules transfectées par GFP et stimulées, \* :  $P < 0.05$ ,  $n=3$ ). (La valeur de l'activité de TNAP pour les cellules transfectées par GFP et stimulées est  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ).

#### V.A.5. L'inhibition de la phospholipase D1 diminue partiellement la minéralisation dans les cellules Saos-2 et les ostéoblastes primaires.

Nous avons utilisé l'halopemide en tant qu'inhibiteur pour les deux isoformes et CAY10593 comme un inhibiteur spécifique de la PLD1. Leurs effets respectifs sur la minéralisation et sur l'activité de TNAP sont déterminés dans les cellules Saos-2 et dans les ostéoblastes primaires stimulés. Le traitement avec  $0.8 \mu\text{M}$  d'halopemide a conduit à une diminution significative de la coloration de l'AR-S de 16% dans les cellules Saos-2 (Fig.25A) et de 14% dans les ostéoblastes primaires stimulés (Fig.25B). Il n'y a pas eu de changement significatif à une concentration de  $0.6 \mu\text{M}$  dans les cellules Saos-2. En outre, le traitement avec CAY10593 a diminué significativement le taux de l'AR-S de 22% à 23% aux concentrations de  $0.6 \mu\text{M}$  et de  $0.8 \mu\text{M}$  respectivement dans les cellules Saos-2 (Fig.25A) alors que la diminution est de 16% à 26% respectivement dans les ostéoblastes primaires (Fig. 25B). Parallèlement, l'ajout de CAY10593 a entraîné une diminution significative de l'activité de TNAP à  $0.6 \mu\text{M}$  dans les cellules Saos-2 (Fig.25C). CAY10593 à  $0.6 \mu\text{M}$  et  $0.8 \mu\text{M}$  a abouti à une diminution significative de l'activité de la TNAP de 17% à 18% respectivement dans les ostéoblastes primaires (Fig.25D). Le traitement en présence de  $0.8 \mu\text{M}$  d'halopemide a entraîné une diminution significative de l'activité de TNAP de 35% dans les ostéoblastes primaires. Cette comparaison se fait par rapport à des cellules stimulées en présence de DMSO ( $0.032\%$  (v : v)). En effet, les inhibiteurs sont préparés dans du DMSO.





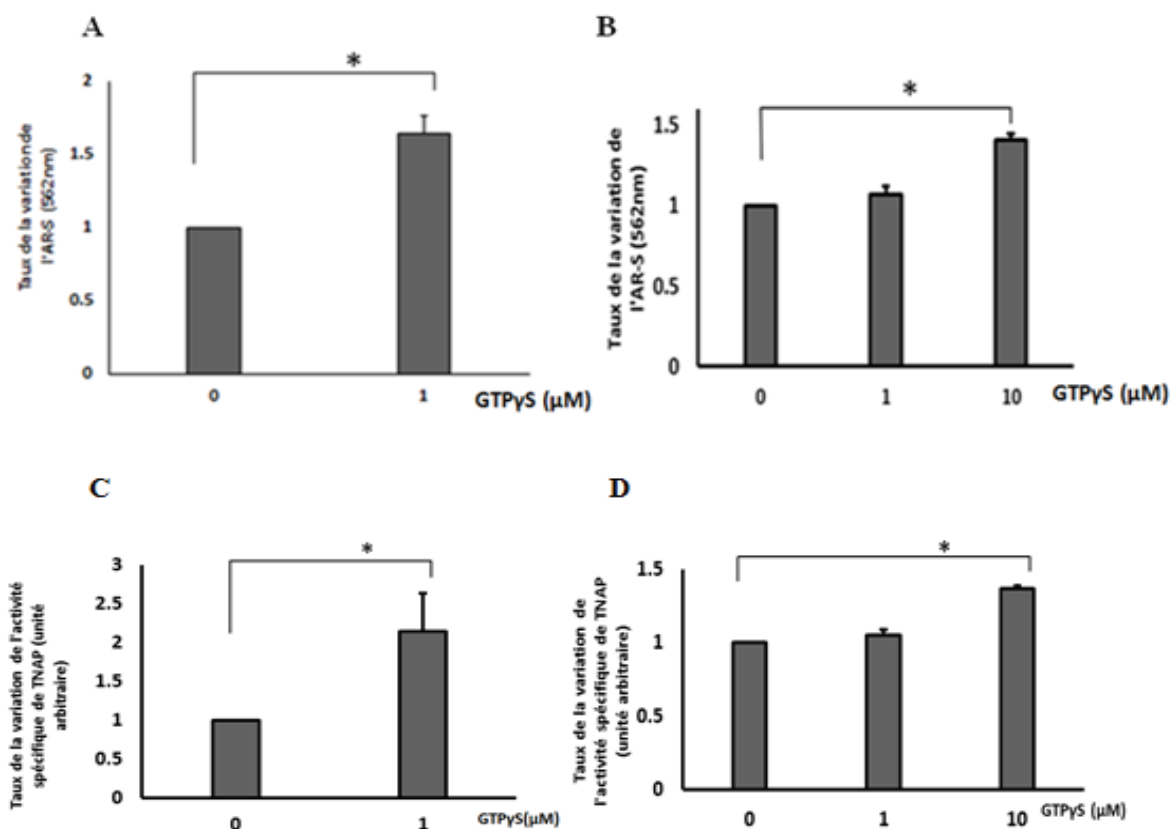
**Figure 25 :** Quantification des minéraux à l'aide de la coloration AR-S (A et B) et mesure de l'activité de TNAP (C et D) dans les cellules stimulées en présence ou non d'halopemide ou de CAY10593 pendant 7 jours pour les Saos-2 (A et C) et pendant 5 jours pour les ostéoblastes primaires après ajout du  $\beta$ -GP (B et D) aux concentrations 0.6  $\mu$ M et 0.8  $\mu$ M. Dans le cas des ostéoblastes primaires, nous avons mis l'inhibiteur en même temps que  $\beta$ -GP. Le chiffre «0 » correspond aux cellules stimulées en absence d'inhibiteurs et la valeur réelle correspondante de l'activité de TNAP est de 7  $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> pour les ostéoblastes primaires et de 20  $\mu$ mol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> pour les Saos-2. La concentration de DMSO est de 0.032% (v : v) dans toutes les cellules en présence ou non d'inhibiteurs. Les valeurs sont normalisées par rapport aux cellules stimulées en absence d'inhibiteurs. (\*, Comparaison par rapport aux cellules stimulées sans inhibiteurs, \* :  $P < 0.5$  et \*\*  $P < 0.01$ ,  $n=3$ ).

Le taux d'inhibition de l'AR-S induit par CAY10593 est plus élevé par rapport à celui induit par l'halopemide: ceci s'explique par le fait que CAY10593 inhibe d'une manière sélective la PLD1. A ce propos l'IC<sub>50</sub> de CAY10593 sur la PLD1 vaut 11nM tandis que l'IC<sub>50</sub> de CAY10593 sur la PLD2 est de 1.8  $\mu$ M. l'IC<sub>50</sub> d'halopemide sur la PLD1 vaut 220 nM tandis

que l'IC<sub>50</sub> d'halopemide sur la PLD2 est de 330nM. Nous avons utilisé l'halopemide à une concentration qui inhibe les deux isoformes PLD1 et PLD2. Nous avons vu que ces inhibiteurs ont une meilleure efficacité d'inhibition de la TNAP par rapport à l'inhibition de la minéralisation (marquage ARS). Ces résultats suggèrent que la PLD1 affecte le processus de la minéralisation.

#### **V.A.6. Les protéines G interviennent dans le processus de la minéralisation physiologique.**

Le GTPγS est utilisé pour activer de façon stable les protéines G. La PLD1, ayant une activité basale faible, est activée par les protéines G monomériques. C'est pour cette raison que nous avons utilisé le GTPγS afin de suivre son effet sur la minéralisation. L'ajout de 1μM de GTPγS induit une augmentation de la coloration de l'AR-S de 50% dans les cellules Saos-2 (Fig.26A) tandis qu'elle est de 41% dans les ostéoblastes primaires en présence de 10μM GTPγS (Fig.26B). Cet accroissement de la minéralisation s'est accompagné d'une double augmentation de l'activité de la TNAP dans les cellules Saos-2 traitées avec 1μM GTPγS (Fig.26C) et de 37% dans les ostéoblastes primaires traitées avec 10μM GTPγS (Fig.26D). Par contre, nous n'avons pas vu de changement d'activité de la TNAP dans les ostéoblastes primaires traitées avec 1μM GTPγS.



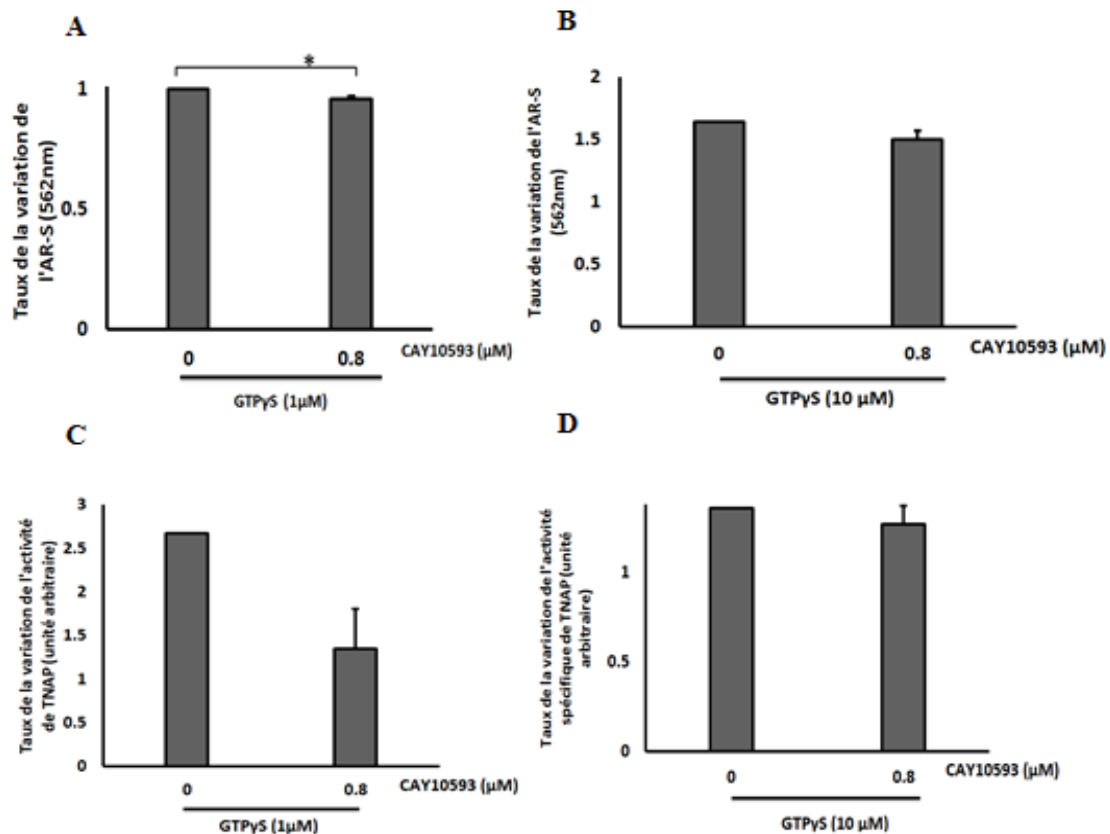
**Figure 26 :** Effet du traitement avec GTPγS dans les cellules Saos-2 (A et C) et les ostéoblastes primaires (B et D) stimulées sur l'AR-S et la TNAP : (A et B) Quantification des minéraux et (C et D) mesure de l'activité TNAP. (\*, comparaison des résultats par rapport aux cellules stimulées sans GTP, \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , le chiffre « 0 » correspond à une valeur réelle de l'activité de TNAP de  $4.3 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  pour les cellules Saos-2 et de  $6 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  pour les ostéoblastes primaires,  $n=3$ ).

Donc, ces résultats suggèrent que GTPγS en stimulant la voie des protéines G pourrait activer le processus de minéralisation.

#### V.A.7. La PLD1 pourrait intervenir dans le processus de la minéralisation physiologique via la voie des protéines G.

Nous avons vu que les protéines G pourraient intervenir dans la minéralisation. Pour vérifier si l'activation de la PLD1 se fait à partir de cette voie, nous avons traité les cellules Saos-2 et les ostéoblastes primaires avec du GTPγS en présence ou non de l'inhibiteur de PLD1, CAY10593, à une concentration de  $0.8 \mu\text{M}$ . Le degré de coloration de l'AR-S et l'activité de TNAP sont inhibés par l'addition concomitante de  $0.8 \mu\text{M}$  CAY10593 et de  $1 \mu\text{M}$  GTPγS dans les cellules Saos-2 (Fig.27A et C). Nous avons observé le même résultat dans les ostéoblastes primaires traités avec  $0.8 \mu\text{M}$  CAY10593 et  $10 \mu\text{M}$  GTPγS (Fig.27B et D). Ces résultats

suggèrent que la stimulation induite par GTP $\gamma$ S est inhibée partiellement par CAY10593. L'expérience sur les Saos-2 concernant le dosage de l'AR-S est faite 3 fois par contre les autres expériences n'ont été faites qu'une seule fois. Sous réserve de reproduire ce résultat plusieurs fois, il semblerait que le GTP $\gamma$ S stimulerait la voie des protéines G qui à son tour stimulerait, entre autres, la PLD1 favorisant la minéralisation.



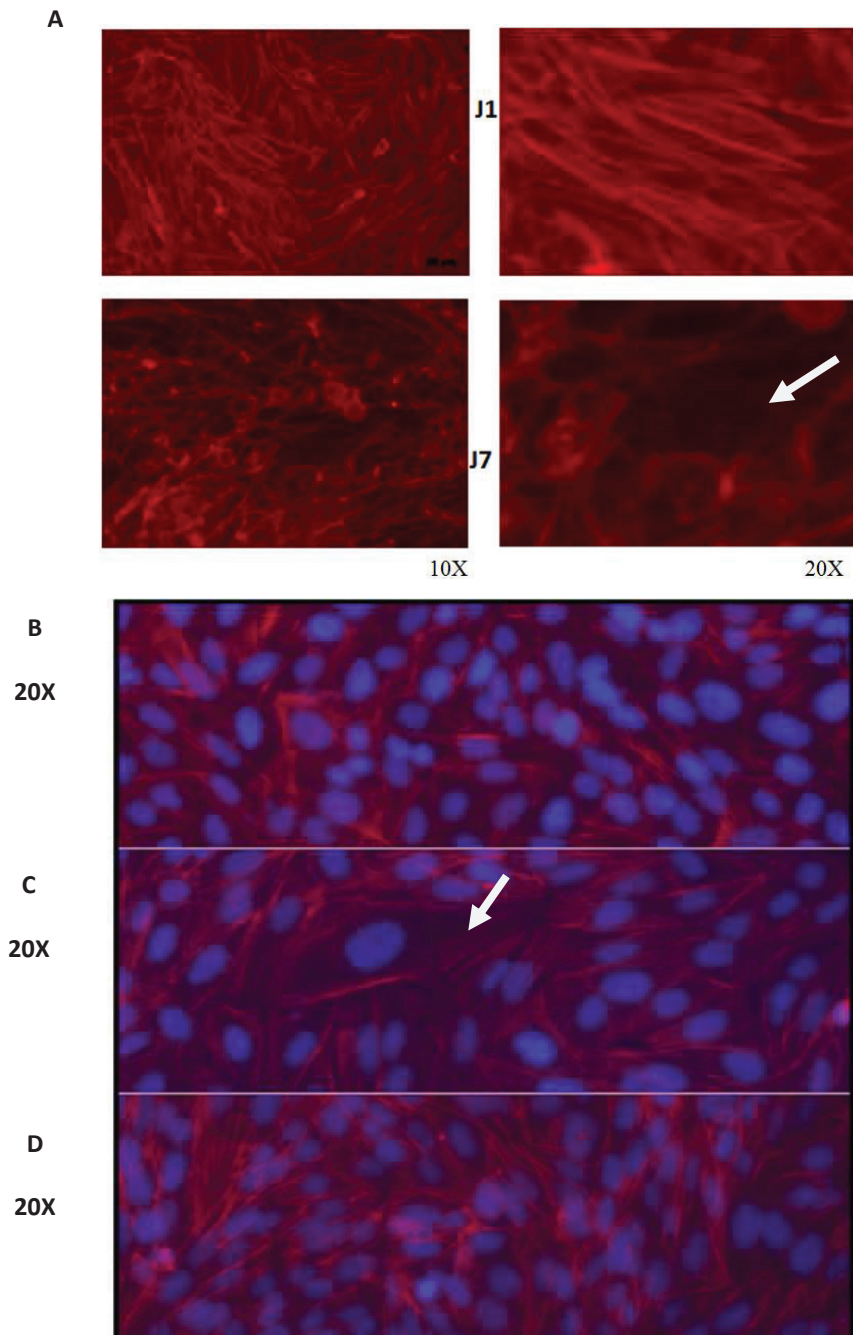
**Figure 27:** Effet de l'inhibiteur CAY10593 sur la minéralisation en présence de GTP $\gamma$ S : Quantification des minéraux (A et B) et mesure de l'activité spécifique de TNAP (C et D) dans les cellules Saos-2 (A et C) et les ostéoblastes primaires (B et D). Le chiffre (0) correspond aux cellules stimulées par AA et  $\beta$ -GP mais en présence de DMSO 0.0032%. (\*, le résultat est comparé aux cellules stimulées sans inhibiteur, \* :  $P < 0.05$ ,  $n=3$ ), (A,  $n=3$ . B, C et D,  $n=1$ ).

#### V.A.8. La PLD1 est impliquée dans le changement de la morphologie des cellules et le réarrangement du cytosquelette d'actine au cours de la minéralisation des cellules Saos-2.

Il est connu que les cellules osseuses changent de morphologie au cours de la différenciation et minéralisation [270]. De plus, dans la littérature, de nombreux travaux ont montré que la PLD joue un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette et dans la morphologie

cellulaire [178]. Nous avons donc émis l'hypothèse que la PLD pourrait intervenir dans le processus de minéralisation via un remaniement du cytosquelette d'actine, permettant un changement de forme des cellules.

Tout d'abord, nous avons suivi au cours du temps l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules Saos-2 en milieu ostéogénique. Le cytosquelette est détecté au microscope à fluorescence après marquage de l'actine F à la phalloïdine couplée à la rhodamine. Les noyaux sont marqués à l'aide du DAPI. Nous avons remarqué un changement de morphologie des cellules Saos-2, en milieu ostéogénique, au cours du temps. Les cellules lors du premier jour de stimulation sont très fines et allongées (Fig.28A), tandis qu'au bout du 7<sup>ème</sup> jour, les cellules sont plus larges et s'étalent (Fig.28A et C). Nous avons cherché à déterminer si la PLD est impliquée dans ce changement de morphologie. Pour cela, nous avons incubé les cellules en milieu ostéogénique en absence ou en présence de l'inhibiteur de PLD1, CAY10593 à une concentration de 0.8µM. Nous avons observé que les cellules contrôles (sans milieu ostéogénique et sans inhibiteur) et celles stimulées en présence de l'inhibiteur de PLD1 sont plus allongées et plus fines (Fig.28B et D) par rapport à celles qui sont stimulées en milieu ostéogénique (Fig.28C). Ces résultats suggèrent que la PLD1 pourrait intervenir, en réarrangeant le cytosquelette d'actine, favorisant ainsi la minéralisation des cellules Saos-2.



**Figure 28 :** Morphologie des cellules et réorganisation des cytosquelettes d'actine au cours de la minéralisation : Les cellules Saos-2 ont été cultivées selon les conditions suivantes : (A) : Cellules en milieu ostéogénique à différents jours de traitement comme indiqué dans la figure : objectifs 10X et 20X, (B) : contrôles au jour 7, (C) : stimulées en milieu ostéogénique au jour 7 et (D) : stimulées en milieu ostéogénique en présence de 0.8μM CAY10593 au jour 7. Les cellules sont fixées, perméabilisées, incubées avec la phalloïdine couplée à la rhodamine puis avec le DAPI pour être observées au microscope à fluorescence.

## **Partie B: La phospholipase D pourrait intervenir dans le processus de la calcification cardiovasculaire.**

Les résultats rapportés dans la partie précédente indiquent que l'action de la PLD, activée par une voie dépendante de la protéine G, module la minéralisation induite par les ostéoblastes. Dans cette partie, nous cherchons à vérifier si la PLD pourrait agir sur la calcification pathologique induite par des CMLs qui se transdifférencient en cellules capables d'induire la minéralisation.

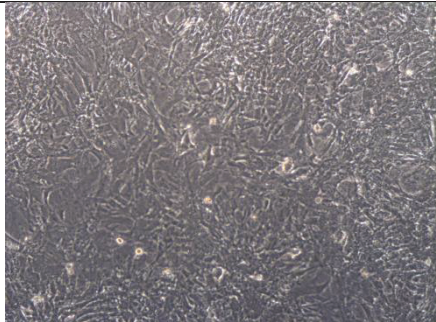
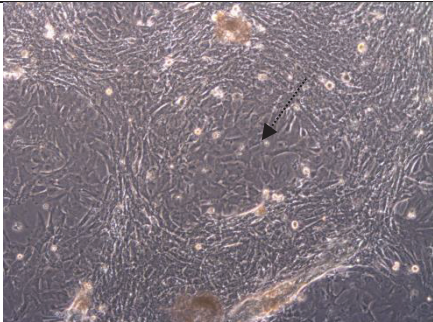


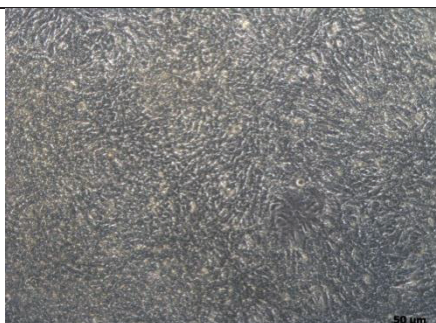
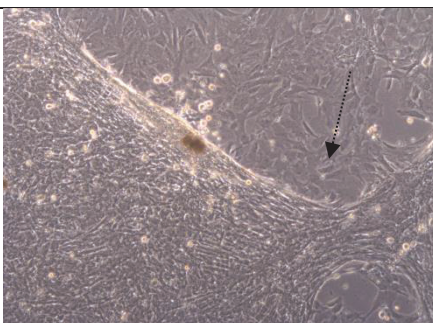

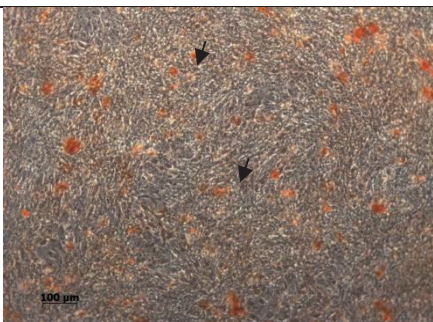
### **V.B.1. Caractérisation des modèles cellulaires et culture *ex vivo***

Afin de mimer la calcification pathologique, des cellules musculaires lisses (CMLs) primaires extraites de l'aorte de rat et des cultures *ex vivo* de l'aorte de rat sont employés.

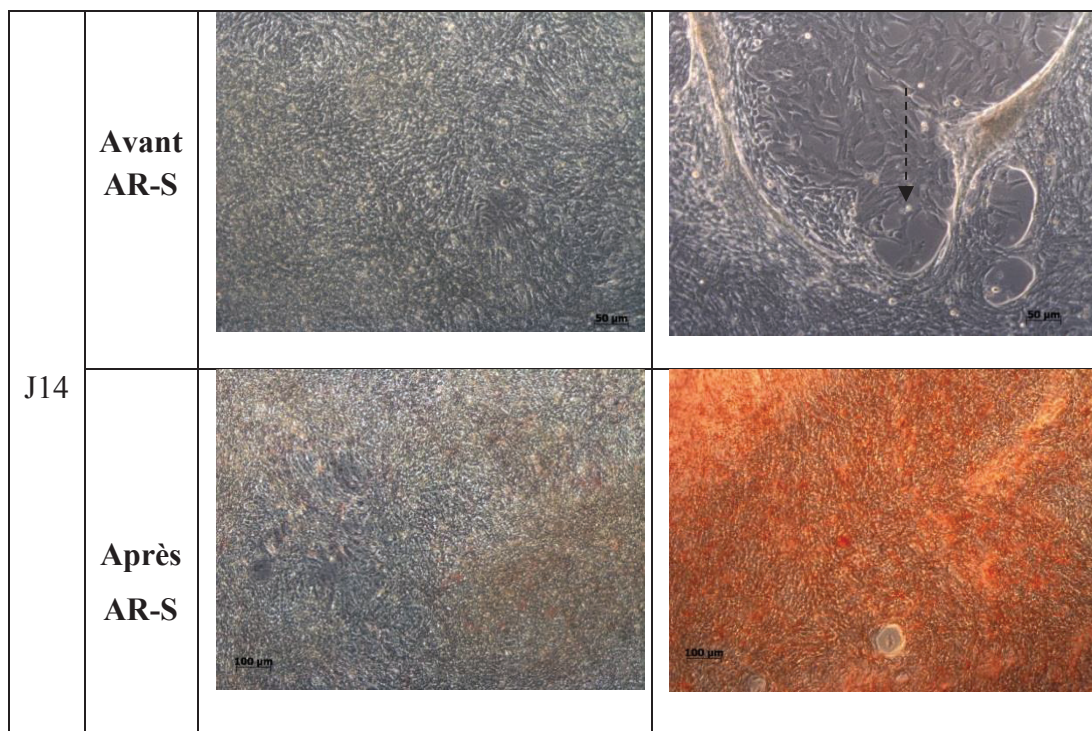
#### ***V.B.1.1. Cellules musculaires lisses primaires***

Les CMLs extraites à partir de l'aorte de rat, sont traitées avec  $50\mu\text{g.ml}^{-1}$  d'AA et 5mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Pi) correspondant à une condition d'hyperphosphatémie pendant plusieurs jours afin d'induire une calcification due à une transdifférenciation des CMLs. L'effet de ce milieu ostéogénique sur le changement morphologique au cours de la transdifférenciation est observé à l'aide d'un microscope en contraste de phase. Nous avons remarqué que les CMLs primaires dans un milieu ostéogénique subissent un effet de migration durant la minéralisation. Après 7, 11 et 14 jours d'incubation, les CMLs sont aptes à migrer de l'extrémité vers le centre par rapport aux cellules non stimulées. Au 7<sup>ème</sup> jour, les CMLs stimulées migrent de façon moins importante que celles incubées pendant 11 ou 14 jours. (Fig.29A) Afin de confirmer que les cellules ont minéralisé dans ce milieu ostéogénique, nous avons détecté la formation des minéraux par AR-S 0.5% au cours du temps. Au jour 7, il n'y a pas eu de différence de coloration de l'AR-S entre les CMLs stimulées et celles non stimulées. Par contre, après 11 jours de traitement, la coloration de l'AR-S a augmenté 1.5 fois par rapport aux cellules non stimulées, tandis qu'après 14 jours, l'augmentation a été deux fois plus importantes (Fig.29A et B). En outre, au bout du 14<sup>ème</sup> jour d'incubation, les CMLs maintenues dans un milieu ostéogénique ont minéralisé de façon plus importante par rapport à celles incubées pendant 11 jours (Fig. 29A et B). En effet, les tâches rouges marquées par l'AR-S reflétant les dépôts phosphocalciques ont augmenté au cours de la minéralisation. Ces résultats montrent que les CMLs sont devenus capables de minéraliser dans les conditions d'hyperphosphatémie.

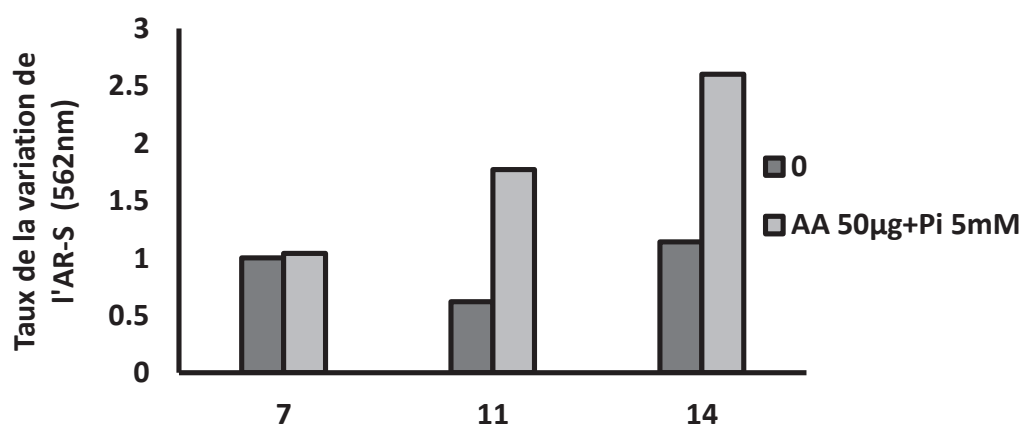


		Contrôle	50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ AA + 5mM Pi
J7	Avant AR-S		
	Après AR-S		
J11	Avant AR-S		
	Après AR-S		



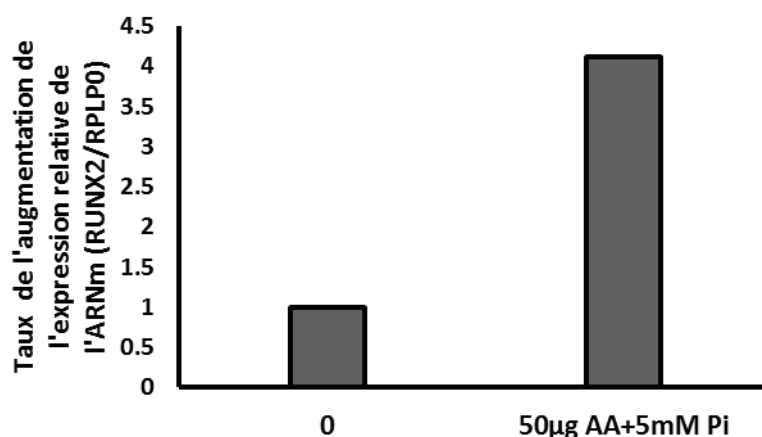


**Figure 29A :** Observation microscopique des CMLs au cours du temps avant et après la coloration par AR-S: Nous avons mis en culture les CMLs pendant des jours différents de traitement (soit J7, J11 ou J14) comme indiqué dans la figure. A gauche : CMLs en milieu de culture non ostéogénique (contrôle), à droite : CMLs en milieu ostéogénique contenant  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$  AA et  $5\text{mM}$  Pi. Les cellules sont visualisées sous un microscope en contraste de phase. (Objectif 10X)



**Figure 29B :** Quantification des minéraux dans les cellules CMLs après traitement avec  $50\mu\text{g.mL}^{-1}$  AA et  $5\text{mM}$  Pi pendant plusieurs jours. Le chiffre « 0 » correspond aux CMLs contrôles.

Pour vérifier que les CMLs se transdifférencient en cellules de type ostéochondrocytaires dans le milieu ostéogénique, nous avons suivi par QPCR, l'expression de l'ARNm de RUNX2 qui est un des marqueurs de la différenciation ostéogénique. Nous avons obtenu une augmentation de l'expression de l'ARNm dans les cellules stimulées quatre fois supérieures par rapport à celles non stimulées (Fig.29C). Cette expression a été normalisée en utilisant le gène de référence RPLP0.



**Figure 29C :** Effet du milieu ostéogénique sur la transdifférenciation des CMLs : expression de l'ARNm de RUNX2 par QPCR dans les CMLs : L'ARN total est extrait à partir des CMLs puis transformé en ADNc par transcription inverse RT. Des amorces sens et anti-sens spécifiques au RUNX2 sont utilisées pour amplifier l'ADNc. L'expression de l'ARNm est normalisée par RPLP0.

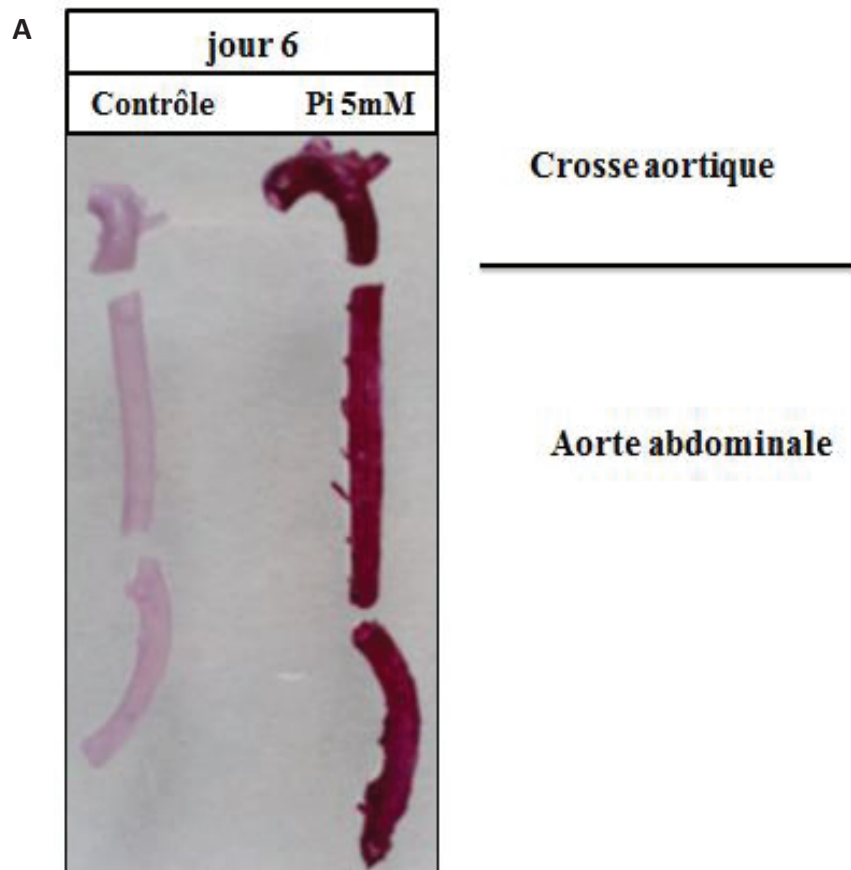
Nos résultats montrent que les CMLs primaires sont bien des cellules capables de minéraliser dans un milieu ostéogénique contenant du Pi 5mM et AA 50µg.ml<sup>-1</sup>. Nous les utiliserons comme un modèle cellulaire de calcification pathologique *in vitro*.

#### ***V.B.1.2. Culture ex vivo de l'aorte de rat***

Nous avons utilisé un modèle de la calcification vasculaire *ex vivo*, déjà décrit dans la littérature [271]. Nous avons mis au point ce modèle de culture dans notre laboratoire. La stimulation de l'aorte avec 5 mM Pi a permis d'induire la minéralisation dans un contexte pathologique. Nous avons caractérisé ce modèle par le marquage des minéraux avec de l'AR-S, le dosage de l'activité de la TNAP ainsi que des expressions de l'ARNm de l'OPN et de RUNX2.

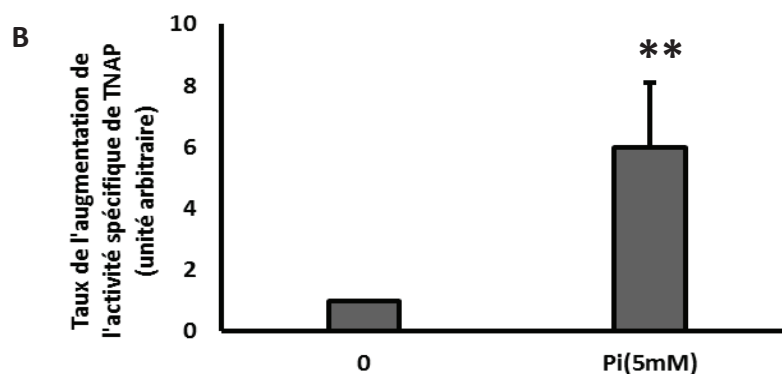
Après l'extraction de l'aorte et sa mise en culture en absence ou en présence de Pi 5mM, nous avons détecté, à l'aide de l'AR-S 0,003 % (m : v), la formation des complexes

phosphocalciques. Au bout du 6<sup>ème</sup> jour, l'aorte stimulée a bien été colorée par AR-S (rouge foncé) par rapport au contrôle qui n'a montré aucune trace de coloration démontrant que le traitement de l'aorte avec 5 mM Pi induit la formation des complexes phosphocalciques (Fig.30A).



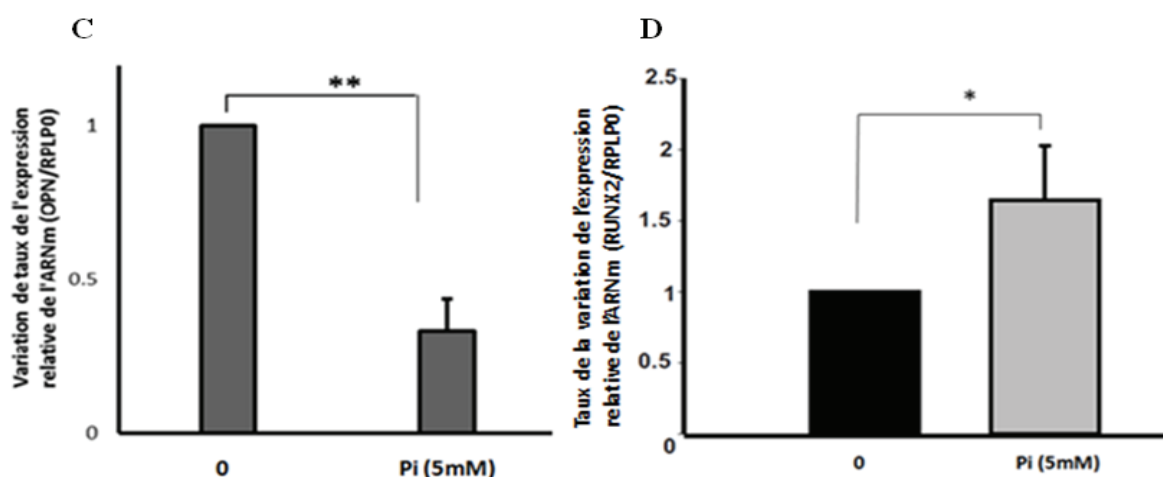
**Figure 30A :** Marquage par AR-S des aortes de rat après six jours. Nous avons incubé les aortes dans un milieu complet DMEM en présence de SVF 10% avec ou sans  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5mM, puis elles sont fixées par 95 % (v : v) éthanol pendant 30 heures. Les aortes sont colorées directement par 0.003 % (m : v) AR-S dans 1% KOH (mg : ml dans  $\text{H}_2\text{O}$ ) pendant 30 heures, puis rincées avec 2% KOH (mg : ml dans  $\text{H}_2\text{O}$ ) et photographiées.

Nous avons vérifié un autre marqueur de minéralisation : la TNAP. Les aortes stimulées par 5 mM Pi après six jours de traitement ont une activité de TNAP significativement 5 fois plus importante que celles non stimulées. (Fig.30B)



**Figure 30B:** Mesure de l'activité de TNAP dans l'aorte pendant 6 jours. La réaction d'hydrolyse de NPP en Pi forme du nitrophénol au bout de cinq minutes et donne une couleur jaune dosée au spectrophotomètre à 405 nm. (\*, comparaison par rapport au milieu de culture sans phosphate 5mM, \*\* :  $P < 0.01$ ,  $n=3$ )

Afin de valider notre modèle ex vivo, nous avons suivi l'expression transcriptionnelle d'un marqueur de différenciation des ostéoblastes qui est le RUNX2 et un marqueur d'inhibition de la CCV qui est l'OPN [272]. Par QPCR, nous avons pu montrer que l'expression de l'ARNm de l'OPN diminue significativement dans le cas d'hyperphosphatémie par rapport au contrôle (Fig.30C). Par contre, l'expression de l'ARNm de RUNX2 augmente significativement dans les conditions d'hyperphosphatémie par rapport à la condition normale. (Fig.30D)

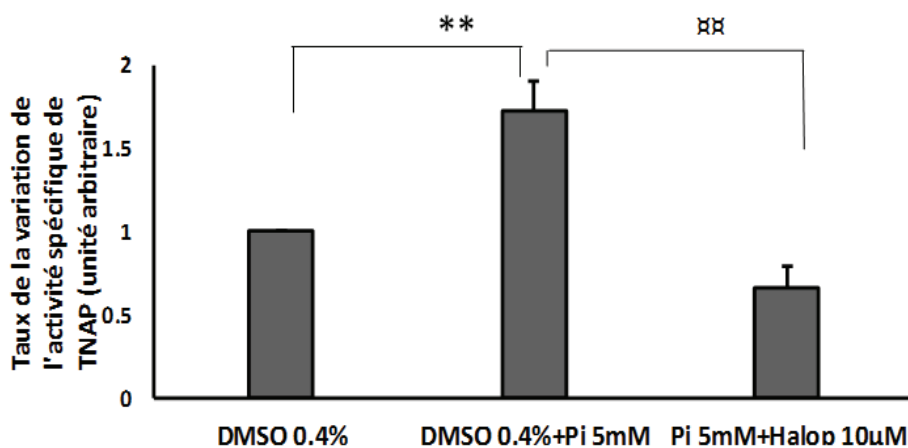


**Figures 30C et D :** Expression de l'ARNm de l'OPN et de RUNX2 par QPCR dans l'aorte de rat: Des amorces sens et anti-sens spécifiques au RUNX2 ont été utilisées pour amplifier l'ADNc. L'expression de l'ARNm est normalisée par RPLP0. ( $n=3$ )

Tous ces résultats confirment que l'aorte en présence de 5mM de Pi est capable de calcifier et d'exprimer des marqueurs de minéralisation tels que la TNAP et RUNX-2. La culture d'aorte de rat *ex vivo* dans des conditions d'hyperphosphatémie est un bon modèle de la CCV.

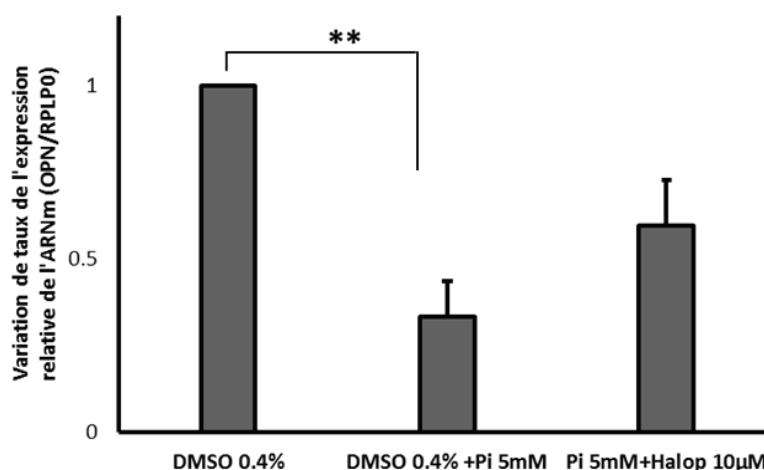
### V.B.2. La phospholipase D est active au cours de la calcification induite dans l'aorte.

Pour mettre en évidence l'action de la PLD dans la CCV, nous avons utilisé un inhibiteur de la PLD, l'halopemide, et nous avons observé l'effet de ce traitement sur un marqueur de minéralisation, l'activité de la TNAP. L'activité de TNAP est augmentée en présence de 5mM de Pi et de 0.4 % de DMSO par rapport au contrôle 0.4 % de DMSO mais sans Pi (Fig. 31). Ce résultat confirme que le DMSO n'affecte pas l'effet du Pi sur l'aorte (Fig. 30B). De plus, l'activité de la TNAP est diminuée de 63% en présence de 10µM d'halopemide. Ceci suggère que la PLD pourrait être impliquée positivement dans la calcification vasculaire.



**Figure 31 :** Effet de l'halopemide sur l'activité de TNAP dans l'aorte: les mêmes annotations que la figure 30B mais en présence de 0.4% (mL : mL) de DMSO. (\*, comparaison entre les aortes stimulées par Pi et DMSO et celles qui sont en présence de DMSO seulement, \*\* :  $P < 0.01$ . □, comparaison entre l'aorte stimulée par Pi et halopemide à celle qui est en présence de DMSO et Pi, □□ :  $P < 0.01$ ,  $n=3$ ).

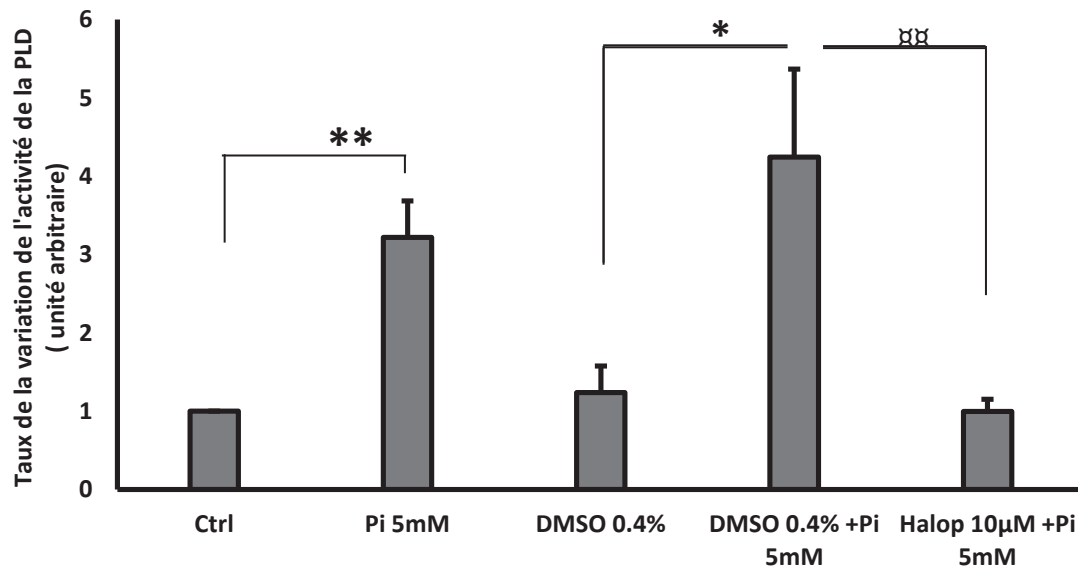
L'expression de l'ARNm de l'OPN (marqueur inhibiteur de la calcification vasculaire) a été déterminée par QPCR. L'addition pendant 6 jours de 5mM de Pi sur l'aorte a induit une diminution significative de son expression tandis que l'ajout de 10µM d'halopemide sur l'aorte a une tendance à l'augmenter de 45% l'expression de l'OPN. Ceci reste à confirmer (Fig. 32).



**Figure 32:** Expression de l'ARNm codant pour l'OPN dans l'aorte par QPCR: Des amorces sens et anti-sens spécifiques à l'OPN ont été utilisées pour amplifier l'ADNc. L'expression de l'ARNm est normalisée par RPLP0. (\*, comparaison entre l'aorte stimulée par Pi et celles non stimulées, \*\*:  $P < 0.01$ ,  $n=3$ ). A noter que l'effet de l'halopemide sur l'expression de l'OPN s'est fait deux fois donc reste à confirmer ( $n=2$ ).

Donc, le Pi a favorisé la minéralisation en augmentant l'activité de TNAP, l'expression de RUNX2 et en diminuant significativement l'expression de l'OPN, par contre l'halopemide a inhibé partiellement l'effet du Pi sur la minéralisation en diminuant significativement l'activité de TNAP et en augmentant l'expression d'OPN.

Afin de confirmer que la PLD agit au cours de la minéralisation de l'aorte induite par une hyperphosphatémie, nous avons mesuré par fluorescence l'activité de la PLD. L'activité de la PLD a augmenté de trois fois en présence de Pi 5mM par rapport au contrôle que ce soit avec ou sans 0.4 % (ml : ml) DMSO (Fig. 33). Par contre, l'addition de 10µM d'halopemide a abouti à une diminution de l'activité de la PLD par rapport à celle mesurée sur l'aorte stimulée par 5mM de Pi pour arriver au niveau basal.



**Figure 33 :** Mesure de l'activité de la PLD dans l'aorte. Les échantillons sont incubés pendant 15 minutes à 37°C en présence de phosphatidylcholine. (\*, comparaison entre les aortes contrôles (avec ou sans DMSO) et celles stimulées par 5mM Pi, \*  $P < 0.05$  et \*\* :  $P < 0.01$ . □, comparaison de l'aorte stimulée par Pi en présence d'halopemide à celle stimulée en présence de DMSO, □ :  $P < 0.05$ ).  $n=3$ .

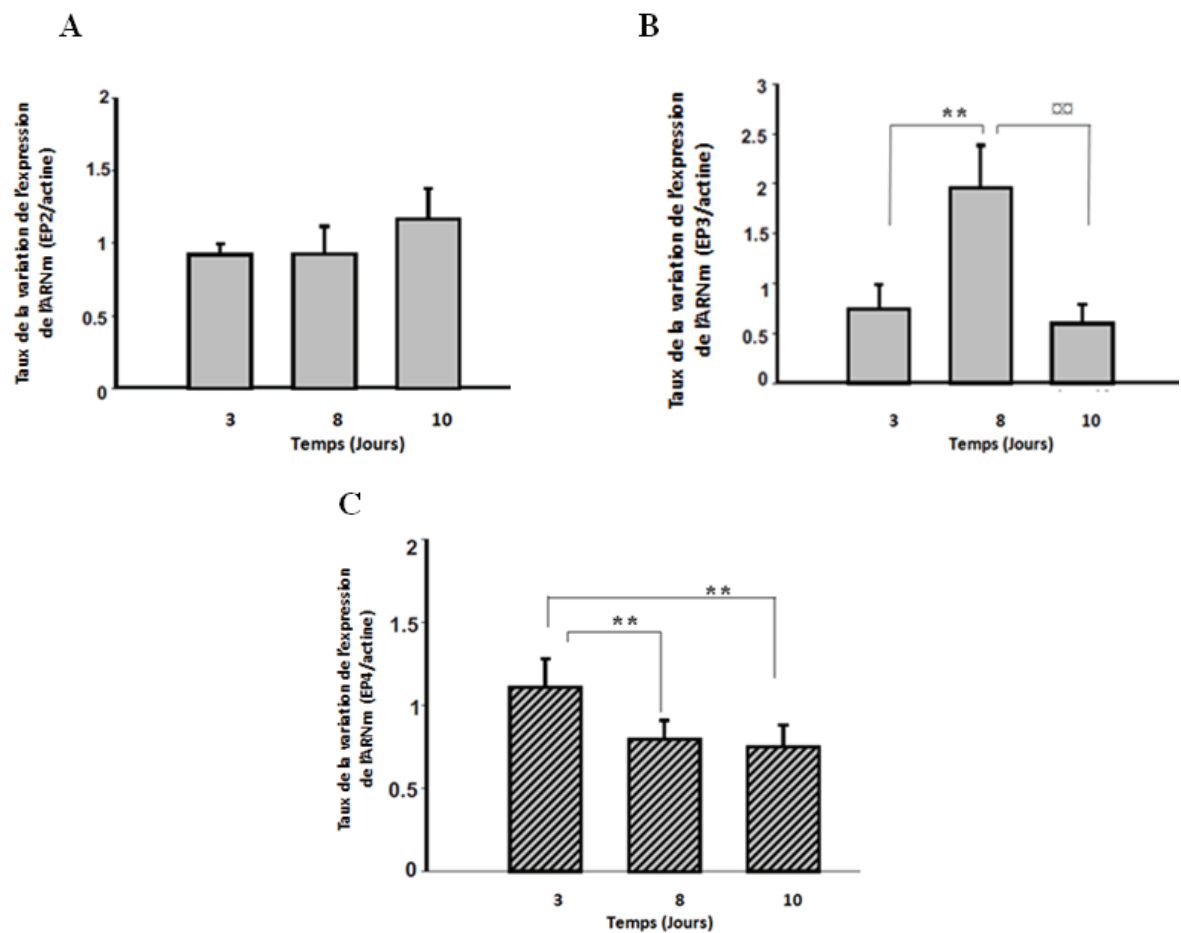
La diminution de l'activité de TNAP ainsi que l'augmentation de l'expression de l'OPN produits par l'addition d'halopemide montrent que la PLD est une enzyme favorisant le processus de la minéralisation de l'aorte stimulée par du Pi.



## **Partie C : Rôles des récepteurs de la prostaglandine PGE2 dans le processus de minéralisation selon les conditions physiologiques.**

Nous voulons vérifier en parallèle si l'action des récepteurs de la PGE2 est favorable aux processus de la minéralisation. Nous avons suivi l'expression de l'ARNm des récepteurs EP2, EP3 et EP4 dans les cellules Saos-2. Nous avons stimulé les cellules dans un milieu ostéogénique contenant  $50\mu\text{g.ml}^{-1}$  et  $7.5\text{mM}$   $\beta$ -GP pendant plusieurs jours. Nous avons pu montrer que tous les récepteurs sont exprimés dans les cellules Saos-2 et leur expression varie pendant la différenciation et la maturation des cellules Saos-2. Concernant l'expression de l'EP2, il n'y a pas eu de variation significative au cours de temps dans les cellules stimulées (Fig. 34A). Par contre, nous avons observé une augmentation significative de l'expression d'EP3 au bout du 8<sup>ème</sup> jour comparativement au 3<sup>ème</sup> jour. Cette expression est diminuée au bout du 10<sup>ème</sup> jour (Fig. 34B). Par ailleurs, l'expression d'EP4 est diminuée au bout du 8<sup>ème</sup> et du 10<sup>ème</sup> jour (Fig. 34C). Ces résultats montrent qu'EP2 n'intervient probablement pas pendant le processus de la minéralisation physiologique car il n'y a aucune variation de son expression au cours du temps. Par contre, EP3 pourrait intervenir dans la phase tardive de la maturation des cellules Saos-2 en cellules capables de minéraliser tandis qu'EP4 l'inhiberait.





**Figure 34 :** Expression de l'ARNm des récepteurs de la prostaglandine PGE2 lors de la maturation des cellules Saos-2 : Des amorces spécifiques à EP2, EP3 et EP4 ont été utilisés pour suivre leur expression génomique par QPCR. A : EP2, B : EP3 et C : EP4. (\*, comparaison par rapport aux cellules stimulées au jour 3, \*\*:  $P < 0.01$ . □, comparaison par rapport aux cellules stimulées au jour 8, □□ :  $P < 0.01$ ,  $n=3$ ).

# **CHAPITRE VI**

## **CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS**

Mon travail de thèse s'est porté sur la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de la biominéralisation physiologique et pathologique telle que la calcification cardiovasculaire (CCV). Nous avons choisi d'analyser deux voies de signalisation, la PLD d'une part et d'autre part, les récepteurs de la PGE<sub>2</sub>. Une régulation croisée entre ces deux voies pourrait être envisagée. En effet, dans la littérature, il est décrit que la PLD peut réguler l'expression de la cyclooxygénase-2 (Cox-2) et donc la production de prostaglandines [266]. Afin de mimer la minéralisation physiologique, nous avons choisi deux modèles cellulaires : les Saos-2 et les ostéoblastes primaires issus de calvaria des souris. En ce qui concerne la minéralisation pathologique, nous avons choisi un modèle cellulaire : les CMLs primaires issues de l'aorte de rat et un modèle de culture *ex vivo* de l'aorte de rat. Il est bien connu que l'AA et le  $\beta$ -GP stimulent la différenciation des ostéoblastes et facilitent leur minéralisation [269]. Ces deux facteurs ostéogéniques sont employés pour induire la différenciation des cellules Saos-2 et les ostéoblastes primaires. Par ailleurs, la stimulation des CMLs de rat est produite par l'addition conjointe de 50 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> AA et 5mM Pi favorisant le dépôt des complexes de phosphate et de calcium et leur différenciation ostéochondrocytaire [273]. Dans le cas de l'aorte, l'addition de 5mM Pi a induit sa calcification *ex vivo* [274].

**PLD1 et minéralisation physiologique** : La différenciation de divers types cellulaires est accompagnée d'une augmentation de l'activité et/ou de l'expression de la PLD, suggérant l'implication de cette enzyme dans le processus de différenciation de différents types cellulaires comme par exemple des cellules myéloïdes humaines [187, 190], des cellules MG-63 en réponse à des surfaces de titane [194] et des cellules musculaires lisses striées [82]. Dans notre travail, nous avons déterminé les niveaux d'expressions des ARNm codant pour les différents types de PLDs ainsi que la présence de PLDs par Western Blot et par des mesures d'activité enzymatique au cours de la différenciation et pendant la minéralisation des ostéoblastes, ce qui n'avait jamais été rapporté jusqu'à maintenant. Nos résultats ont montré que les deux variantes d'épissage de la PLD1 (PLD1a et PLD1b) et la PLD2 d'origine humaine sont exprimées dans les cellules Saos-2 et que cette expression a varié au cours de la différenciation. De plus, l'expression de la PLD1 et non celle de la PLD2 a augmenté au 5<sup>ème</sup> jour de la différenciation des Saos-2, et s'est stabilisé jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour. Cela est corrélé avec l'activité de la PLD qui a atteint le maximum au bout du 5<sup>ème</sup> jour dans un milieu ostéogénique. La diminution de l'activité totale de la PLD à partir du 6<sup>ème</sup> jour indique néanmoins que la PLD1 a été active pendant le stade de la minéralisation des cellules Saos-2. En effet, ces cellules ont commencé à minéraliser au 5<sup>ème</sup> jour de stimulation en milieu

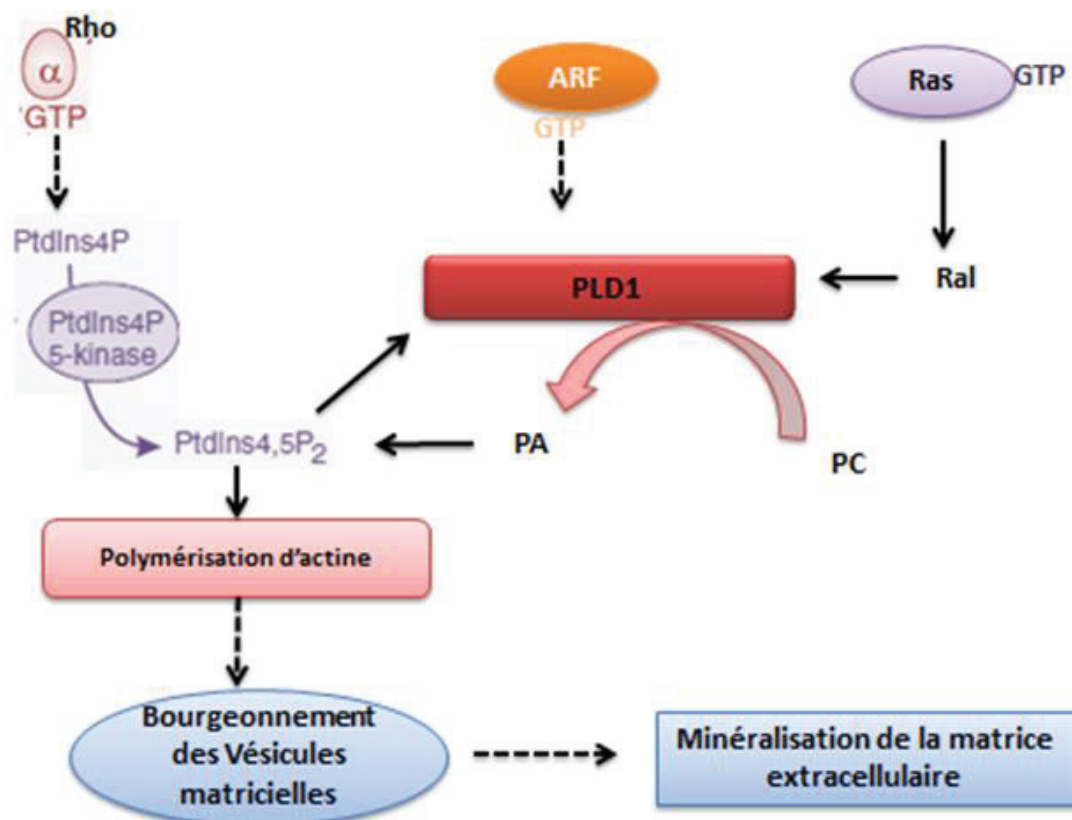
ostéogénique. Pour les ostéoblastes primaires, l'activité a augmenté significativement au 6<sup>ème</sup> jour de traitement avec de l'AA et du  $\beta$ -GP puis elle a diminué au 7<sup>ème</sup> jour.

La corrélation entre l'expression de la PLD et son activité est décrite lors de la différenciation de nombreux types cellulaires : des cellules MG-63, des cellules neuronales et des cellules musculaires striées de rat [193, 194].

La surexpression de la PLD à l'aide des plasmides recombinants pE-GFP-PLD1 et pE-GFP-PLD2 entraîne une augmentation de la minéralisation des Saos-2 qui est plus importante pour la PLD1 que pour la PLD2 comme indiquée par la coloration AR-S et par l'activité de la TNAP. L'addition des inhibiteurs des PLDs tels que l'Halopemide et le CAY10593 diminue la minéralisation induite par les ostéoblastes de l'ordre de 16% et de 22% respectivement. Ce résultat est cohérent avec le fait que CAY10593 inhibe de 21% l'activité de TNAP dans les ostéoblastes. L'inhibition produite par ces inhibiteurs est partielle suggérant qu'il y a plusieurs autres voies de signalisation, que celle de la PLD, qui interviennent dans le processus de minéralisation que celle de la PLD. Par ailleurs, nous avons remarqué que le taux de l'inhibition induit par l'halopemide (inhibiteur moins spécifique) est pratiquement proche de celui induit par CAY10593 (inhibiteur plus spécifique de la PLD1), suggérant que c'est l'activité de la PLD1 et non celle de la PLD2 qui favorise la minéralisation. Le fait que les deux isoformes ont des fonctions différentes dans un même type cellulaire a déjà été rapporté. Par exemple, dans les mastocytes la PLD2 et non la PLD1 est impliquée dans la formation des « ruffles » au niveau de l'actine corticale, après stimulation antigénique [275]. La PLD1 et non la PLD2 participe à la formation des fibres de stress dans les fibroblastes [79]. Cette différence dans les rôles physiologiques des deux isoformes de PLD peut être attribuée au fait qu'elles ont des modes de régulation et des localisations subcellulaires distinctes [88]. Concernant l'implication de la PLD dans le processus de minéralisation, son intervention au niveau du remodelage du cytosquelette d'actine pourrait être considérée. En outre, il est connu que le cytosquelette d'actine contrôle le changement morphologique de la cellule [178], et que la PLD est liée physiquement et fonctionnellement au cytosquelette d'actine [79, 276]. Nous avons montré par marquage de l'actine que les cellules deviennent plus larges et s'étalent au cours de la minéralisation alors qu'elles sont plus fines et plus allongées en présence de CAY10593, indiquant un réarrangement de cytosquelette différent. Il a été rapporté que la PLD1 se lie directement à l'actine filamenteuse, et que le site liant l'actine se situe dans les premiers 155 acides aminés de l'extrémité N-terminale de la PLD1. Par ailleurs, la PLD1 se co-localise avec l'actine néoformée qui maintient la structure de la membrane plasmique [277]. La PLD1 possède une activité basale faible qui est fortement

stimulée par des petites protéines G monomériques et des protéines kinases. Afin d'identifier la voie de signalisation par laquelle la PLD1 favoriserait la minéralisation, nous avons ajouté un analogue de GTP non hydrolysable, GTP $\gamma$ S, qui est perméable aux cellules. L'ajout de GTP $\gamma$ S a stimulé la minéralisation des ostéoblastes, démontrant que les protéines G sont activées pendant le processus de minéralisation physiologique. Par contre, le CAY10593 l'a inhibé légèrement comme indiqué par la coloration à l'AR-S et par la mesure d'activité de TNAP.

Comment la PLD pourrait contribuer à la réorganisation du cytosquelette d'actine reste une question avec des réponses hypothétiques. Diverses données dans la littérature permettent de proposer l'action du PIP2 comme un messenger phospholipidique. Une des voies de signalisation induite par des protéines G comme Rho et Rac dans la polymérisation d'actine est dépendante de PIP2. PIP2 est un cofacteur crucial de la PLD favorisant la synthèse de PA [158]. Par ailleurs, PA favorise la formation de PIP2 [163]. Cette régulation réciproque entre PIP2 et PA augmente la production de PA et active la PLD1 favorisant une réorganisation du cytosquelette d'actine. D'autres protéines G telles que Ras, qui dépend du récepteur tyrosine kinase (TRK), et la protéine ARF pourraient activer la PLD1 et donc la synthèse de PA. (Fig. 35)



**Figure 35:** Action possible de la PLD1 dans la minéralisation physiologique

En conclusion, nous proposons une hypothèse selon laquelle la PLD1 par l'intermédiaire de son produit d'hydrolyse PA, affecterait la minéralisation en déstabilisant la structure de la membrane plasmique modifiant le réarrangement des cytosquelettes d'actine qui serait dépendant de la voie des protéines G (Fig. 35). Ce réarrangement du cytosquelette d'actine et la déstabilisation de la membrane plasmique favoriseraient la formation des VMs, chargées de TNAP, qui sont essentielles à l'initialisation de la minéralisation. Cette hypothèse reste à vérifier car nous n'avons pas démontré un accroissement de la formation des VMs induite par une surexpression de PLD1.

**PLD et CCV:** La calcification vasculaire est maintenant reconnue comme un processus pathologique complexe conduisant aux calcifications tissulaire et cellulaire. Bien qu'il n'existe aucune thérapie actuelle pour le traitement direct des calcifications vasculaires [278], de nombreux efforts sont entrepris afin d'atténuer la gravité et de stopper la progression des symptômes. La calcification ectopique comme la CCV peut résulter d'une réaction inflammatoire [279]. Il a été montré que l'inflammation induite par TNF $\alpha$  *in vivo* dépend de la PLD1 [280] suggérant que la PLD1 pourrait être une cible thérapeutique dans les maladies inflammatoires. La PLD2 agit au cours de la prolifération, l'adhésion et la diffusion des cellules musculaires lisses (CMLs) de l'aorte de rat qui sont des phénomènes liés à l'hypertension et l'athérosclérose après stimulation par l'angiotensine [281]. Les deux isoformes PLD1 et PLD2 sont exprimées dans les CMLs du porc. De plus, une activité et une expression nucléaire de la PLD1 sont détectées [103]. Toutes ces observations nous ont permis d'émettre l'hypothèse que la PLD pourrait être une enzyme active dans la pathogenèse de CCV. L'augmentation de la concentration de Pi dans le cytoplasme des CMLs a inhibé l'expression des gènes spécifiques aux CMLs et a favorisé l'expression des marqueurs ostéochondrocytaires [272]. Dans ce travail, l'hyperphosphatémie de l'aorte a servi à reproduire les conditions de la CCV. Pour la première fois, nous avons pu mettre en évidence l'action de la PLD dans le processus de la CCV. Après la caractérisation d'un modèle *ex vivo* de l'aorte de rat, nous avons pu détecter une augmentation de l'activité de la PLD au cours de la calcification aortique. Celle-ci est accompagnée d'une augmentation de l'activité de la TNAP et de l'expression de RUNX2 ainsi qu'une diminution de l'expression de l'ARNm de l'OPN. Par contre, l'addition d'halopemide –un inhibiteur de l'activité de PLD- a conduit comme espéré à une diminution de l'activité de la PLD qui est suivie d'une diminution de l'activité de TNAP et d'une tendance à une augmentation de l'expression de l'OPN. Ces résultats confirment que l'activité de la PLD favorise la minéralisation et que son inhibition

diminue la minéralisation. Ces résultats suggèrent que l'activité de la PLD, par la libération de PA, pourrait favoriser la minéralisation et par conséquent la CCV. De plus la migration des CMLs et leur transdifférenciation pourrait dépendre du degré d'activité de la PLD, mais le mécanisme reste à élucider.

**EPs et minéralisation physiologique :** Les prostaglandines, en particulier la PGE2, ont de multiples effets sur les os, y compris pendant la stimulation de la résorption et la formation osseuse à la fois [282, 283]. La PGE2 est un puissant inducteur de la formation de l'os corticale et trabéculaire chez les humains et les animaux. La PGE2 administrée à des rats *in vivo* augmente la masse osseuse corticale ainsi que trabéculaire [284-287]. Des mutations génétiques des récepteurs de la PGE2 mettent en évidence l'implication du récepteur EP4 dans la résorption osseuse [257]. *In vitro*, la formation des ostéoclastes dépend de l'expression du récepteur EP4 dans les ostéoblastes. Ces observations ont été confirmées *in vivo* dans des souris déficientes en EP4 dont la résorption osseuse est inhibée. Les souris déficientes en EP2, montrent que EP2 est impliqué partiellement dans la résorption osseuse par contre des souris déficients en EP1 favorise la différenciation des ostéoblastes et la réparation osseuse [264]. Il n'est pas toujours possible d'identifier définitivement le type du récepteur EP qui est actif soit dans la formation ou soit dans la résorption osseuse. Ceci est principalement dû aux effets variables de la PGE2 qui dépendent du type de cellule utilisée et de son stade de maturation. Nous avons montré que le récepteur EP3 est impliqué dans la phase tardive de la minéralisation physiologique, tandis qu'EP4 inhibe la minéralisation et la maturation des Saos-2 et donc pourrait être un mécanisme contribuant à la résorption osseuse. Cependant, il faudrait d'autres expériences pour valider leur effet sur la minéralisation en utilisant des agonistes et des antagonistes, afin de déterminer leurs voies de signalisation au cours de la maturation et leur corrélation avec la minéralisation.

# **CHAPITRE VII**

## **PERSPECTIVES**



**En ce qui concerne les actions des phospholipases D dans la minéralisation**, il faudrait préciser quelle est la nature de la protéine G intervenant dans l'activation de la PLD1 : Arf, Rho et/ou Rac afin de déterminer la voie de signalisation et son mécanisme de régulation. Nous pourrions utiliser des inhibiteurs de la protéine ARF, la Brefeldine A qui inhibe l'échange GDP/GTP au niveau de la protéine, mais aussi inactiver la protéine Rho par l'exoenzyme C3 de *C. Boulinum*. La transfection stable pour les deux isoformes, l'addition de PLD exogène et la mise en silence des gènes exprimant les isoformes de PLD (siRNA des PLD1 et PLD2) sont des techniques qui permettront de confirmer leurs effets sur la maturation et la différenciation des ostéoblastes mais aussi sur la transdifférenciation des CMLs *in vitro*. Nous proposons une hypothèse selon laquelle la PLD1 par l'intermédiaire de son produit d'hydrolyse PA, affecterait la minéralisation en déstabilisant la structure de la membrane plasmique et en affectant le réarrangement des cytosquelettes d'actine. Ce réarrangement du cytosquelette d'actine et la déstabilisation de la membrane plasmique favoriseraient la formation des VMs, qui sont essentielles à l'initialisation de la minéralisation. Il serait possible de vérifier cette hypothèse en quantifiant les VMs après surexpression de la PLD1 dans les cellules.

Dans le prolongement de ce travail, il serait nécessaire de faire une analyse de la formation osseuse par radiographie des rayons X ou par microphotographie des souris n'exprimant plus la PLD (souris PLD1-/-) [288] ceci permettrait de valider nos résultats obtenus *in vitro*.

**En ce qui concerne les rôles de la PLD dans la CCV**, il faudra préciser l'isoforme impliqué dans ce processus en utilisant les inhibiteurs spécifiques afin de trouver le mécanisme par lequel la PLD induit la CCV. Des modèles d'animaux : inflammatoire, hypertension ou diabétique pourraient contribuer à définir les actions des deux isoformes avant et après le cas pathologique.

**En ce qui concerne les rôles des récepteurs de la PGE2**, nous devons confirmer l'expression des différents récepteurs au cours de la minéralisation, au niveau des ostéoblastes primaires mais aussi au niveau des CMLs primaires. De plus les effets de la PGE2, l'inhibition de l'expression de Cox-2 ainsi que les rôles des récepteurs de PGE2 seront évalués à l'aide d'outils de biologie moléculaire (siRNA, transfection avec des plasmides codant les protéines d'intérêt) et de biochimie (western blot, dosage d'activité de TNAP, expression de marqueurs de minéralisation et différenciation).

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Das, S. and J.C. Crockett, *Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment*. Drug Des Devel Ther, 2013. **7**: p. 435-48.
2. Sabharwal, R., et al., *An Insight in to Paget's Disease of Bone*: Niger J Surg. 2014 Jan;20(1):9-15.
3. Lv, Q.W., et al., *Comparison of Tripterygium wilfordii Hook F with methotrexate in the treatment of active rheumatoid arthritis (TRIFRA): a randomised, controlled clinical trial*. Ann Rheum Dis, 2014. **14**(10): p. 2013-204807.
4. Shetty, A., et al., *Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond*. Drug Des Devel Ther, 2014. **8**: p. 349-64.
5. BANKS W.J. *Osteogenesis*. In: Banks W.J., *Applied Veterinary Histology*, 3rd Edition. Mosby Year Book : Baltimore, 1993, 127-141.
6. Lee, N.K., et al., *Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton*. Cell, 2007. **130**(3): p. 456-69.
7. Heino, T.J. and T.A. Hentunen, *Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2008. **3**(2): p. 131-45.
8. Chen, Q., et al., *Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation*. Dev Biol, 1995. **172**(1): p. 293-306.
9. Buchet, R., et al., *Isolation and characteristics of matrix vesicles*. Methods Mol Biol, 2013: p. 562-0\_7.
10. Anderson, H.C., R. Garimella, and S.E. Tague, *The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 822-37.
11. Flanagan, A.M., *The osteoclast, which derives from a haemopoietic stem cell, is not depleted in aplastic anaemia*. J Pathol, 1990. **162**(3): p. 261-3.
12. D'après Manuel MARK, I.d.E., Faculté de Médecine et Hôpital Universitaire de Strasbourg, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire.
13. Aubin, J.E., et al., *Osteoblast and chondroblast differentiation*. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77S-83S.
14. Ducy, P., *Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology*. Dev Dyn, 2000. **219**(4): p. 461-71.
15. Acampora, D., et al., *Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene Dlx5*. Development, 1999. **126**(17): p. 3795-809.
16. Newberry, E.P., T. Latifi, and D.A. Towler, *The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter*. Biochemistry, 1999. **38**(33): p. 10678-90.
17. Nakashima, K., et al., *The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation*. Cell. **108**(1): p. 17-29.
18. Civitelli, R., *Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 188-92.
19. Aubin, J.E. and E. Bonnellye, *Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption*. Medscape Womens Health, 2000. **5**(2): p. 5.
20. BANKS W.J. *Supportive Tissues – Bone*. In: Banks W.J., *Applied Veterinary Histology*, 3rd Edition. Mosby Year Book Inc: Baltimore, 1993, 107-126.
21. Chen, J.M., et al., *An energetic evaluation of a "Smith" collagen microfibril model*. J Protein Chem, 1991. **10**(5): p. 535-52.
22. D'après Benoît Leblanc, u.d.S., canada.
23. ALBERTS B., B.D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K, WATSON J.D., *Jonctions cellulaires, adhérence cellulaire et matrice extracellulaire*. , in Alberts B., Bray D.,

- Lewis J., Raff M., Roberts K, Watson J.D. et al. *Biologie Moléculaire de la Cellule*. 3e Edition. Médecine- Sciences, Flammarion : Paris, 1995. p. 949-1010.
24. Aumailley, M. and R. Timpl, *Attachment of cells to basement membrane collagen type IV*. J Cell Biol, 1986. **103**(4): p. 1569-75.
  25. Lucas, P.A., P.A. Price, and A.I. Caplan, *Chemotactic response of mesenchymal cells, fibroblasts and osteoblast-like cells to bone Gla protein*. Bone, 1988. **9**(5): p. 319-23.
  26. Woodley, D.T., *Importance of the dermal-epidermal junction and recent advances*. Dermatologica, 1987. **174**(1): p. 1-10.
  27. [bio.winona.msus.edu/berg/illustr/fibronectin.gif](http://bio.winona.msus.edu/berg/illustr/fibronectin.gif).
  28. Hauschka, P.V., et al., *Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone*. Physiol Rev, 1989. **69**(3): p. 990-1047.
  29. Yamauchi, M., et al., *Relationships between undercarboxylated osteocalcin and vitamin K intakes, bone turnover, and bone mineral density in healthy women*. Clinical Nutrition, 2010. **29**(6): p. 761-765.
  30. Hauschka, P.V. and F.H. Wians, Jr., *Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone*. Anat Rec, 1989. **224**(2): p. 180-8.
  31. Fujisawa, R., et al., *Acidic amino acid-rich sequences as binding sites of osteonectin to hydroxyapatite crystals*. Biochim Biophys Acta, 1996. **4**(1): p. 53-60.
  32. Balcerzak, M., et al., *The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process*. Acta Biochim Pol, 2003. **50**(4): p. 1019-38.
  33. Koch, H., J.A. Jadowiec, and P.G. Campbell, *Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells*. Stem Cells Dev, 2005. **14**(6): p. 621-31.
  34. Yu, X., X. Zhang, and B. Zeng, *Expression of transforming growth factor beta1 and insulin-like growth factor I in the regenerated bones after low frequency micro movement*. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2006. **20**(7): p. 685-9.
  35. Croucher, P.I., W.R. Gilks, and J.E. Compston, *Evidence for interrupted bone resorption in human iliac cancellous bone*. J Bone Miner Res, 1995. **10**(10): p. 1537-43.
  36. D'après Dr. M.H. Lafage - Proust, l.d.b.e.b.d.t.o., INSERM U 1059, UJM, St-etienne.
  37. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
  38. Chambers, T.J., J.A. Darby, and K. Fuller, *Mammalian collagenase predisposes bone surfaces to osteoclastic resorption*. Cell Tissue Res, 1985. **241**(3): p. 671-5.
  39. Chambers, T.J. and K. Fuller, *Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact*. J Cell Sci, 1985. **76**: p. 155-65.
  40. Rousselle, A.V. and D. Heymann, *Osteoclastic acidification pathways during bone resorption*. Bone, 2002. **30**(4): p. 533-540.
  41. Hakeda, Y. and M. Kumegawa, *[Osteoclasts in bone metabolism]*. Kaibogaku Zasshi, 1991. **66**(4): p. 215-25.
  42. Udagawa, N., *Mechanisms involved in bone resorption*. Biogerontology, 2002. **3**(1-2): p. 79-83.
  43. Bergmann, P., *[Local factors in bone repair]*. Rev Med Brux, 1989. **10**(10): p. 419-23.
  44. Haque, T., et al., *An immunohistochemical analysis of the temporal and spatial expression of growth factors FGF 1, 2 and 18, IGF 1 and 2, and TGFbeta1 during distraction osteogenesis*. Histol Histopathol, 2007. **22**(2): p. 119-28.
  45. van Bezooijen, R.L., et al., *Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist*. J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 805-14.
  46. Winkler, D.G., et al., *Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist*. Embo J, 2003. **22**(23): p. 6267-76.

47. Eigel, B.A., S.A. Stier, and C. Wakem, *Non-osseous bone scan abnormalities in multiple myeloma associated with hypercalcemia*. Clin Nucl Med, 1988. **13**(12): p. 869-73.
48. Raggi, P., *Effects of excess calcium load on the cardiovascular system measured with electron beam tomography in end-stage renal disease*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(2): p. 332-5.
49. Zhou, X., Y. Cui, and J. Han, *Phosphate/pyrophosphate and MV-related proteins in mineralisation: discoveries from mouse models*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(6): p. 778-90.
50. Brancaccio, D. and M. Cozzolino, *The mechanism of calcium deposition in soft tissues*. Contrib Nephrol, 2005. **149**: p. 279-86.
51. Nguyen, C., et al., *Calcifications in human osteoarthritic articular cartilage: ex vivo assessment of calcium compounds using XANES spectroscopy*. J Synchrotron Radiat, 2011. **18**(Pt 3): p. 475-80.
52. Dessombz, A., et al., *Revisiting the chemical diversity in prostatic calculi: a SEM and FT-IR investigation*. Prog Urol, 2011. **21**(13): p. 940-5.
53. Dessombz, A., et al., *Prostatic stones: evidence of a specific chemistry related to infection and presence of bacterial imprints*. PLoS ONE, 2012. **7**(12): p. 13.
54. Dorfmueller, P., et al., *Crystalline ultrastructures, inflammatory elements, and neoangiogenesis are present in inconspicuous aortic valve tissue*. Cardiol Res Pract, 2010. **28**(685926): p. 685926.
55. Buckwalter, J.A. and H.J. Mankin, *Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation*. Instr Course Lect, 1998. **47**: p. 487-504.
56. Dozin, B., et al., *Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: molecular and cellular aspects*. Matrix Biol, 2002. **21**(5): p. 449-59.
57. de Oliveira, R.B., et al., *Vascular calcification in chronic kidney disease: a review*. J Bras Nefrol, 2013. **35**(2): p. 147-61.
58. KAHLE W, L.H., PLATZER W, Anatomie. Tome 2, viscères. 2 éd.Paris : Flammarion Médecine-Sciences, 1990 et STEVENS A, LOWE J, Histologie humaine. and Paris : DeBoeck Université.
59. Temmar, M., et al., *Pulse wave velocity and vascular calcification at different stages of chronic kidney disease*. J Hypertens, 2010. **28**(1): p. 163-9.
60. Lei, Y., et al., *Hydroxyapatite and calcified elastin induce osteoblast-like differentiation in rat aortic smooth muscle cells*. Exp Cell Res, 2014. **323**(1): p. 198-208.
61. Scott, S., et al., *Human vascular smooth muscle cells from restenosis or in-stent stenosis sites demonstrate enhanced responses to p53: implications for brachytherapy and drug treatment for restenosis*. Circ Res, 2002. **90**(4): p. 398-404.
62. Littlewood, T.D. and M.R. Bennett, *Apoptotic cell death in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2003. **14**(5): p. 469-75.
63. Kockx, M.M., *Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(10): p. 1519-22.
64. Proudfoot, D., et al., *Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies*. Circ Res, 2000. **87**(11): p. 1055-62.
65. Shao, J.S., J. Cai, and D.A. Towler, *Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1423-30.



66. Tyson, K.L., et al., *Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(3): p. 489-94.
67. Hosaka, N., et al., *Elastin degradation accelerates phosphate-induced mineralization of vascular smooth muscle cells*. *Calcif Tissue Int*, 2009. **85**(6): p. 523-9.
68. Chillon, J.M., et al., *Pathophysiological mechanisms and consequences of cardiovascular calcifications: role of uremic toxicity*. *Ann Pharm Fr*, 2009. **67**(4): p. 234-40.
69. Luo, G., et al., *Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein*. *Nature*, 1997. **386**(6620): p. 78-81.
70. Speer, M.Y., et al., *Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo*. *J Exp Med*, 2002. **196**(8): p. 1047-55.
71. Schafer, C., et al., *The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(3): p. 357-66.
72. Collin-Osdoby, P., *Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin*. *Circ Res*, 2004. **95**(11): p. 1046-57.
73. Mebarek, S., et al., *Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: roles in physiological and pathological mineralizations*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(3): p. 5036-129.
74. Murakami, M., et al., *Recent progress in phospholipase A(2) research: from cells to animals to humans*. *Prog Lipid Res*, 2011. **50**(2): p. 152-92.
75. Roberts, S., et al., *Functional involvement of PHOSPHO1 in matrix vesicle-mediated skeletal mineralization*. *J Bone Miner Res*, 2007. **22**(4): p. 617-27.
76. Ktistakis, N.T., et al., *Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles*. *J Cell Biol*, 1996. **134**(2): p. 295-306.
77. Gasman, S., et al., *Regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells: focus on ARF and Rho GTPases*. *Cell Signal*, 2003. **15**(10): p. 893-9.
78. Zeniou-Meyer, M., et al., *Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(30): p. 21746-57.
79. Kam, Y. and J.H. Exton, *Phospholipase D activity is required for actin stress fiber formation in fibroblasts*. *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(12): p. 4055-66.
80. Roach, A.N., et al., *Phosphatidic acid regulation of PIPKI is critical for actin cytoskeletal reorganization*. *J Lipid Res*, 2012. **53**(12): p. 2598-609.
81. Fang, M., et al., *The role of phospholipase D in osteoblast response to titanium surface microstructure*. *J Biomed Mater Res A*, 2010. **93**(3): p. 897-909.
82. Komati, H., et al., *Phorbol ester-induced differentiation of L6 myogenic cells involves phospholipase D activation*. *FEBS Lett*, 2004. **577**(3): p. 409-14.
83. Yamada, M., et al., *Overexpression of phospholipase D prevents actinomycin D-induced apoptosis through potentiation of phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in Chinese-hamster ovary cells*. *Biochem J*, 2004. **378**(Pt 2): p. 649-56.
84. Park, S.H., et al., *Assignment of human PLD1 to human chromosome band 3q26 by fluorescence in situ hybridization*. *Cytogenet Cell Genet*, 1998. **82**(3-4): p. 224.
85. Katayama, K., et al., *Cloning, differential regulation and tissue distribution of alternatively spliced isoforms of ADP-ribosylation-factor-dependent phospholipase D from rat liver*. *Biochem J*, 1998. **329**(Pt 3): p. 647-52.

86. Hammond, S.M., et al., *Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C-alpha*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3860-8.
87. Hammond, S.M., et al., *Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family*. J Biol Chem, 1995. **270**(50): p. 29640-3.
88. Colley, W.C., et al., *Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization*. Curr Biol, 1997. **7**(3): p. 191-201.
89. Lopez, I., R.S. Arnold, and J.D. Lambeth, *Cloning and initial characterization of a human phospholipase D2 (hPLD2). ADP-ribosylation factor regulates hPLD2*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 12846-52.
90. Park, S.H., et al., *Assignment of human PLD2 to chromosome band 17p13.1 by fluorescence in situ hybridization*. Cytogenet Cell Genet, 1998. **82**(3-4): p. 225.
91. Steed, P.M., et al., *Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants*. Faseb J, 1998. **12**(13): p. 1309-17.
92. Gibbs, T.C. and K.E. Meier, *Expression and regulation of phospholipase D isoforms in mammalian cell lines*. J Cell Physiol, 2000. **182**(1): p. 77-87.
93. Vorland, M., V.A. Thorsen, and H. Holmsen, *Phospholipase D in platelets and other cells*. Platelets, 2008. **19**(8): p. 582-94.
94. Liscovitch, M., et al., *Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family*. Biochem J, 2000. **3**: p. 401-15.
95. Rizzo, M. and G. Romero, *Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade*. Pharmacol Ther, 2002. **94**(1-2): p. 35-50.
96. Zhang, Y., et al., *Loss of receptor regulation by a phospholipase D1 mutant unresponsive to protein kinase C*. Embo J, 1999. **18**(22): p. 6339-48.
97. Becker, K.P. and Y.A. Hannun, *Protein kinase C and phospholipase D: intimate interactions in intracellular signaling*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(13): p. 1448-61.
98. D'après Cockcroft, S., *Signalling roles of mammalian phospholipase D1 and D2*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(11): p. 1674-87.
99. Liscovitch, M., et al., *Localization and possible functions of phospholipase D isozymes*. Biochim Biophys Acta, 1999. **30**(2): p. 245-63.
100. Freyberg, Z., et al., *Intracellular localization of phospholipase D1 in mammalian cells*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 943-55.
101. Freyberg, Z., S. Bourgoin, and D. Shields, *Phospholipase D2 is localized to the rims of the Golgi apparatus in mammalian cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(11): p. 3930-42.
102. Du, G., et al., *Phospholipase D2 localizes to the plasma membrane and regulates angiotensin II receptor endocytosis*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1024-30.
103. Gayral, S., et al., *Selective activation of nuclear phospholipase D-1 by g protein-coupled receptor agonists in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 2006. **99**(2): p. 132-9.
104. Hughes, W.E. and P.J. Parker, *Endosomal localization of phospholipase D 1a and 1b is defined by the C-termini of the proteins, and is independent of activity*. Biochem J, 2001. **356**(Pt 3): p. 727-36.
105. Sugars, J.M., et al., *Hierarchy of membrane-targeting signals of phospholipase D1 involving lipid modification of a pleckstrin homology domain*. J Biol Chem, 2002. **277**(32): p. 29152-61.

106. Sugars, J.M., et al., *Fatty acylation of phospholipase D1 on cysteine residues 240 and 241 determines localization on intracellular membranes*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30023-7.
107. Liu, M.Y., S. Gutowski, and P.C. Sternweis, *The C terminus of mammalian phospholipase D is required for catalytic activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5556-62.
108. Du, G., et al., *Regulation of phospholipase D1 subcellular cycling through coordination of multiple membrane association motifs*. J Cell Biol, 2003. **162**(2): p. 305-15.
109. Xie, Z., W.T. Ho, and J.H. Exton, *Association of N- and C-terminal domains of phospholipase D is required for catalytic activity*. J Biol Chem, 1998. **273**(52): p. 34679-82.
110. Balboa, M.A. and P.A. Insel, *Nuclear phospholipase D in Madin-Darby canine kidney cells. Guanosine 5'-O-(thiotriphosphate)-stimulated activation is mediated by RhoA and is downstream of protein kinase C*. J Biol Chem, 1995. **270**(50): p. 29843-7.
111. Jang, Y.H. and S. Min do, *Nuclear localization of phospholipase D1 mediates the activation of nuclear protein kinase C(alpha) and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways*. J Biol Chem, 2011. **286**(6): p. 4680-9.
112. Lee, S., et al., *Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(30): p. 28252-60.
113. Honda, A., et al., *Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation*. Cell, 1999. **99**(5): p. 521-32.
114. Selvy, P.E., et al., *Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 6064-119.
115. Sung, T.C., et al., *Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity*. Embo J, 1997. **16**(15): p. 4519-30.
116. Frohman, M.A., T.C. Sung, and A.J. Morris, *Mammalian phospholipase D structure and regulation*. Biochim Biophys Acta, 1999. **30**(2): p. 175-86.
117. Sung, T.C., et al., *Structural analysis of human phospholipase D1*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3659-66.
118. Sung, T.C., et al., *Molecular analysis of mammalian phospholipase D2*. J Biol Chem, 1999. **274**(1): p. 494-502.
119. Sciorra, V.A., et al., *Identification of a phosphoinositide binding motif that mediates activation of mammalian and yeast phospholipase D isoenzymes*. Embo J, 1999. **18**(21): p. 5911-21.
120. Hanoune T. Prix Nobel de Médecine: Alfred C. Gilman, M.R., *Les protéines G un relais de transmission du signal entre récepteur et second messenger cellulaire*. Med Sei 1994; 10: 1183-4.
121. Paduch, M., F. Jelen, and J. Otlewski, *Structure of small G proteins and their regulators*. Acta Biochim Pol, 2001. **48**(4): p. 829-50.
122. Bowman, E.P., D.J. Uhlinger, and J.D. Lambeth, *Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(29): p. 21509-12.
123. Sekine, A., M. Fujiwara, and S. Narumiya, *Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase*. J Biol Chem, 1989. **264**(15): p. 8602-5.
124. Hofmann, F., et al., *Localization of the glucosyltransferase activity of Clostridium difficile toxin B to the N-terminal part of the holotoxin*. J Biol Chem, 1997. **272**(17): p. 11074-8.



125. Malcolm, K.C., C.M. Elliott, and J.H. Exton, *Evidence for Rho-mediated agonist stimulation of phospholipase D in rat1 fibroblasts. Effects of Clostridium botulinum C3 exoenzyme.* J Biol Chem, 1996. **271**(22): p. 13135-9.
126. Meacci, E., et al., *Effect of Rho and ADP-ribosylation factor GTPases on phospholipase D activity in intact human adenocarcinoma A549 cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18605-12.
127. Ren, X.D., et al., *Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells.* Mol Biol Cell, 1996. **7**(3): p. 435-42.
128. Chong, L.D., et al., *The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells.* Cell, 1994. **79**(3): p. 507-13.
129. Pertile, P., et al., *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis is required for activation of phospholipase D in U937 cells.* J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5130-5.
130. Schmidt, M., et al., *A role for rho-kinase in rho-controlled phospholipase D stimulation by the m3 muscarinic acetylcholine receptor.* J Biol Chem, 1999. **274**(21): p. 14648-54.
131. Brown, H.A., et al., *ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity.* Cell, 1993. **75**(6): p. 1137-44.
132. Cockcroft, S., et al., *Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes.* Science, 1994. **263**(5146): p. 523-6.
133. Shome, K., C. Vasudevan, and G. Romero, *ARF proteins mediate insulin-dependent activation of phospholipase D.* Curr Biol, 1997. **7**(6): p. 387-96.
134. Shome, K., Y. Nie, and G. Romero, *ADP-ribosylation factor proteins mediate agonist-induced activation of phospholipase D.* J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30836-41.
135. Shome, K., et al., *The activation of phospholipase D by endothelin-1, angiotensin II, and platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle A10 cells is mediated by small G proteins of the ADP-ribosylation factor family.* Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 2200-8.
136. Houle, M.G., et al., *ADP-ribosylation factor translocation correlates with potentiation of GTP gamma S-stimulated phospholipase D activity in membrane fractions of HL-60 cells.* J Biol Chem, 1995. **270**(39): p. 22795-800.
137. Rumenapp, U., et al., *Evidence for ADP-ribosylation-factor-mediated activation of phospholipase D by m3 muscarinic acetylcholine receptor.* Eur J Biochem, 1995. **234**(1): p. 240-4.
138. Massenburg, D., et al., *Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11718-22.
139. Cavenagh, M.M., et al., *Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane.* J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 21767-74.
140. Franco, M., et al., *ARNO3, a Sec7-domain guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factor 1, is involved in the control of Golgi structure and function.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 9926-31.
141. Kim, J.H., et al., *Activation of phospholipase D1 by direct interaction with ADP-ribosylation factor 1 and RalA.* FEBS Lett, 1998. **430**(3): p. 231-5.
142. Jiang, H., et al., *Involvement of Ral GTPase in v-Src-induced phospholipase D activation.* Nature, 1995. **378**(6555): p. 409-12.
143. Luo, J.Q., et al., *Functional association between Arf and RalA in active phospholipase D complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3632-7.

144. Frankel, P., et al., *Ral and Rho-dependent activation of phospholipase D in v-Raf-transformed cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **255**(2): p. 502-7.
145. Schmidt, M., et al., *Specific inhibition of phorbol ester-stimulated phospholipase D by Clostridium sordellii lethal toxin and Clostridium difficile toxin B-1470 in HEK-293 cells. Restoration by Ral GTPases*. J Biol Chem, 1998. **273**(13): p. 7413-22.
146. Pai, J.K., et al., *Overexpression of protein kinase C beta 1 enhances phospholipase D activity and diacylglycerol formation in phorbol ester-stimulated rat fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(2): p. 598-602.
147. Eldar, H., et al., *Up-regulation of phospholipase D activity induced by overexpression of protein kinase C-alpha. Studies in intact Swiss/3T3 cells and in detergent-solubilized membranes in vitro*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12560-4.
148. Balboa, M.A., et al., *Protein kinase C alpha mediates phospholipase D activation by nucleotides and phorbol ester in Madin-Darby canine kidney cells. Stimulation of phospholipase D is independent of activation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C and phospholipase A2*. J Biol Chem, 1994. **269**(14): p. 10511-6.
149. Lopez, I., D.J. Burns, and J.D. Lambeth, *Regulation of phospholipase D by protein kinase C in human neutrophils. Conventional isoforms of protein kinase C phosphorylate a phospholipase D-related component in the plasma membrane*. J Biol Chem, 1995. **270**(33): p. 19465-72.
150. Davis, P.D., et al., *Potent selective inhibitors of protein kinase C*. FEBS Lett, 1989. **259**(1): p. 61-3.
151. Min, D.S., E.G. Kim, and J.H. Exton, *Involvement of tyrosine phosphorylation and protein kinase C in the activation of phospholipase D by H2O2 in Swiss 3T3 fibroblasts*. J Biol Chem, 1998. **273**(45): p. 29986-94.
152. Trilivas, I., P.M. McDonough, and J.H. Brown, *Dissociation of protein kinase C redistribution from the phosphorylation of its substrates*. J Biol Chem, 1991. **266**(13): p. 8431-8.
153. Uings, I.J., et al., *Tyrosine phosphorylation is involved in receptor coupling to phospholipase D but not phospholipase C in the human neutrophil*. Biochem J, 1992. **281**(Pt 3): p. 597-600.
154. Bourgoin, S. and S. Grinstein, *Peroxides of vanadate induce activation of phospholipase D in HL-60 cells. Role of tyrosine phosphorylation*. J Biol Chem, 1992. **267**(17): p. 11908-16.
155. Natarajan, V., W.M. Scribner, and S. Vepa, *Regulation of phospholipase D by tyrosine kinases*. Chem Phys Lipids, 1996. **80**(1-2): p. 103-16.
156. Natarajan, V., et al., *Role of protein tyrosine phosphorylation in H2O2-induced activation of endothelial cell phospholipase D*. Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 1): p. L400-8.
157. Ito, Y., S. Nakashima, and Y. Nozawa, *Hydrogen peroxide-induced phospholipase D activation in rat pheochromocytoma PC12 cells: possible involvement of Ca2+-dependent protein tyrosine kinase*. J Neurochem, 1997. **69**(2): p. 729-36.
158. Liscovitch, M., et al., *Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D*. J Biol Chem, 1994. **269**(34): p. 21403-6.
159. Hodgkin, M.N., et al., *Phospholipase D regulation and localisation is dependent upon a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-specific PH domain*. Curr Biol, 2000. **10**(1): p. 43-6.
160. Schmidt, M., et al., *Restoration of Clostridium difficile toxin-B-inhibited phospholipase D by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Eur J Biochem, 1996. **240**(3): p. 707-12.

161. Lukowski, S., et al., *Fodrin inhibits phospholipases A2, C, and D by decreasing polyphosphoinositide cell content*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(2): p. 278-84.
162. Chung, J.K., et al., *Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15980-5.
163. Jenkins, G.H., P.L. Fiset, and R.A. Anderson, *Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid*. J Biol Chem, 1994. **269**(15): p. 11547-54.
164. Moritz, A., et al., *Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7207-10.
165. Yokozeki, T., et al., *Partially purified RhoA-stimulated phospholipase D activity specifically binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. J Neurochem, 1996. **66**(3): p. 1234-9.
166. Lukowski, S., et al., *Inhibition of phospholipase D activity by fodrin. An active role for the cytoskeleton*. J Biol Chem, 1996. **271**(39): p. 24164-71.
167. Lee, C., et al., *Inhibition of phospholipase D by clathrin assembly protein 3 (AP3)*. J Biol Chem, 1997. **272**(25): p. 15986-92.
168. Jenco, J.M., et al., *Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins*. Biochemistry, 1998. **37**(14): p. 4901-9.
169. Xie, M.S., L.S. Jacobs, and G.R. Dubyak, *Regulation of phospholipase D and primary granule secretion by P2-purinergic- and chemotactic peptide-receptor agonists is induced during granulocytic differentiation of HL-60 cells*. J Clin Invest, 1991. **88**(1): p. 45-54.
170. Chen, Y.G., et al., *Phospholipase D stimulates release of nascent secretory vesicles from the trans-Golgi network*. J Cell Biol, 1997. **138**(3): p. 495-504.
171. Vitale, N., et al., *Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells*. Embo J, 2001. **20**(10): p. 2424-34.
172. Bhattacharya, M., et al., *Ral and phospholipase D2-dependent pathway for constitutive metabotropic glutamate receptor endocytosis*. J Neurosci, 2004. **24**(40): p. 8752-61.
173. Shen, Y., L. Xu, and D.A. Foster, *Role for phospholipase D in receptor-mediated endocytosis*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(2): p. 595-602.
174. Dall'Armi, C., et al., *The phospholipase D1 pathway modulates macroautophagy*. Nat Commun, 2010. **1**(142).
175. Zhou, G.L., H. Zhang, and J. Field, *Mammalian CAP (Cyclase-associated protein) in the world of cell migration: Roles in actin filament dynamics and beyond*. Cell Adh Migr. 2014 Jan 1;8(1):55-59. Epub 2013 Jan 1.
176. Bae, Y.K., et al., *The role of FGF signaling in guiding coordinate movement of cell groups: guidance cue and cell adhesion regulator?* Cell Adh Migr, 2012. **6**(5): p. 397-403.
177. Rudge, S.A. and M.J. Wakelam, *Inter-regulatory dynamics of phospholipase D and the actin cytoskeleton*. Biochim Biophys Acta, 2009. **9**: p. 856-61.
178. Ha, K.S. and J.H. Exton, *Activation of actin polymerization by phosphatidic acid derived from phosphatidylcholine in IIC9 fibroblasts*. J Cell Biol, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1789-96.
179. Cross, M.J., et al., *Stimulation of actin stress fibre formation mediated by activation of phospholipase D*. Curr Biol, 1996. **6**(5): p. 588-97.
180. Ha, K.S., E.J. Yeo, and J.H. Exton, *Lysophosphatidic acid activation of phosphatidylcholine-hydrolysing phospholipase D and actin polymerization by a pertussis toxin-sensitive mechanism*. Biochem J, 1994. **303**(Pt 1): p. 55-9.



181. Porcelli, A.M., et al., *Phospholipase D stimulation is required for sphingosine-1-phosphate activation of actin stress fibre assembly in human airway epithelial cells*. Cell Signal, 2002. **14**(1): p. 75-81.
182. Komati, H., et al., *Phospholipase D is involved in myogenic differentiation through remodeling of actin cytoskeleton*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(3): p. 1232-44.
183. Ridley, A.J. and A. Hall, *Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase*. Embo J, 1994. **13**(11): p. 2600-10.
184. Su, W., et al., *RhoA-mediated Phospholipase D1 signaling is not required for the formation of stress fibers and focal adhesions*. Cell Signal, 2006. **18**(4): p. 469-78.
185. Di Fulvio, M. and J. Gomez-Cambronero, *Phospholipase D (PLD) gene expression in human neutrophils and HL-60 differentiation*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(6): p. 999-1007.
186. Bechoua, S. and L.W. Daniel, *Phospholipase D is required in the signaling pathway leading to p38 MAPK activation in neutrophil-like HL-60 cells, stimulated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31752-9.
187. El Marjou, M., et al., *Modifications in phospholipase D activity and isoform expression occur upon maturation and differentiation in vivo and in vitro in human myeloid cells*. Leukemia, 2000. **14**(12): p. 2118-27.
188. Guillemain, I. and J.H. Exton, *Role of rho proteins in agonist regulation of phospholipase D in HL-60 cells*. Biochim Biophys Acta, 1998. **21**: p. 1-3.
189. Nakamura, M., et al., *Involvement of tyrosine phosphorylation in inhibition of fMLP-induced PLD activation by N-acetyl-L-cysteine in differentiated HL60 cells*. J Leukoc Biol, 1998. **63**(6): p. 781-9.
190. Nakashima, S., et al., *Increased mRNA expression of phospholipase D (PLD) isozymes during granulocytic differentiation of HL60 cells*. Biochim Biophys Acta, 1998. **23**(3): p. 173-7.
191. Ohguchi, K., S. Nakashima, and Y. Nozawa, *Phospholipase D development during differentiation of human promyelocytic leukemic HL60 cells*. Biochim Biophys Acta, 1999. **30**(2): p. 215-27.
192. Di Fulvio, M., et al., *Phospholipase D2 (PLD2) shortens the time required for myeloid leukemic cell differentiation: mechanism of action*. J Biol Chem, 2012. **287**(1): p. 393-407.
193. Yoshimura, S., et al., *Differential mRNA expression of phospholipase D (PLD) isozymes during cAMP-induced differentiation in C6 glioma cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **225**(2): p. 494-9.
194. Kim, M.J., M.U. Choi, and C.W. Kim, *Activation of phospholipase D1 by surface roughness of titanium in MG63 osteoblast-like cell*. Biomaterials, 2006. **27**(32): p. 5502-11.
195. Noh, D.Y., et al., *Overexpression of phospholipase D1 in human breast cancer tissues*. Cancer Lett, 2000. **161**(2): p. 207-14.
196. Zhao, Y., et al., *Increased activity and intranuclear expression of phospholipase D2 in human renal cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **278**(1): p. 140-3.
197. Park, M.H., et al., *Overexpression of phospholipase D enhances matrix metalloproteinase-2 expression and glioma cell invasion via protein kinase C and protein kinase A/NF-kappaB/Sp1-mediated signaling pathways*. Carcinogenesis, 2009. **30**(2): p. 356-65.
198. Yamada, Y., et al., *Association of a polymorphism of the phospholipase D2 gene with the prevalence of colorectal cancer*. J Mol Med, 2003. **81**(2): p. 126-31.
199. Plevin, R., et al., *Multiple sources of sn-1,2-diacylglycerol in platelet-derived-growth-factor-stimulated Swiss 3T3 fibroblasts. Evidence for activation of phosphoinositidase*

- C and phosphatidylcholine-specific phospholipase D*. Biochem J, 1991. **279**(Pt 2): p. 559-65.
200. Motoike, T., et al., *Induction of phosphatidic acid by fibroblast growth factor in cultured baby hamster kidney fibroblasts*. FEBS Lett, 1993. **332**(1-2): p. 164-8.
  201. Song, J., Y.W. Jiang, and D.A. Foster, *Epidermal growth factor induces the production of biologically distinguishable diglyceride species from phosphatidylinositol and phosphatidylcholine via the independent activation of type C and type D phospholipases*. Cell Growth Differ, 1994. **5**(1): p. 79-85.
  202. Liu, Y. and B.L. Fanburg, *Phospholipase D signaling in serotonin-induced mitogenesis of pulmonary artery smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **295**(3): p. 11.
  203. Joseph, T., et al., *Phospholipase D overcomes cell cycle arrest induced by high-intensity Raf signaling*. Oncogene, 2002. **21**(22): p. 3651-8.
  204. Zhong, M., et al., *Phospholipase D prevents apoptosis in v-Src-transformed rat fibroblasts and MDA-MB-231 breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(3): p. 615-9.
  205. Foster, D.A. and L. Xu, *Phospholipase D in cell proliferation and cancer*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(11): p. 789-800.
  206. Lavieri, R.R., et al., *Design, synthesis, and biological evaluation of halogenated N-(2-(4-oxo-1-phenyl-1,3,8-triazaspiro[4.5]decan-8-yl)ethyl)benzamides: discovery of an isoform-selective small molecule phospholipase D2 inhibitor*. J Med Chem, 2010. **53**(18): p. 6706-19.
  207. Ohguchi, K., et al., *Negative regulation of melanogenesis by phospholipase D1 through mTOR/p70 S6 kinase 1 signaling in mouse B16 melanoma cells*. J Cell Physiol, 2005. **205**(3): p. 444-51.
  208. Snider, A.J., et al., *Epidermal growth factor increases lysophosphatidic acid production in human ovarian cancer cells: roles for phospholipase D2 and receptor transactivation*. Am J Physiol Cell Physiol, 2010. **298**(1): p. 28.
  209. Williger, B.T., W.T. Ho, and J.H. Exton, *Phospholipase D mediates matrix metalloproteinase-9 secretion in phorbol ester-stimulated human fibrosarcoma cells*. J Biol Chem, 1999. **274**(2): p. 735-8.
  210. Hui, L., et al., *Phospholipase D elevates the level of MDM2 and suppresses DNA damage-induced increases in p53*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(13): p. 5677-86.
  211. Hui, L., et al., *Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D*. Oncogene, 2006. **25**(55): p. 7305-10.
  212. Chen, Y., V. Rodrik, and D.A. Foster, *Alternative phospholipase D/mTOR survival signal in human breast cancer cells*. Oncogene, 2005. **24**(4): p. 672-9.
  213. Zhao, C., et al., *Phospholipase D2-generated phosphatidic acid couples EGFR stimulation to Ras activation by Sos*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 706-12.
  214. Jang, Y.H., et al., *Cleavage of phospholipase D1 by caspase promotes apoptosis via modulation of the p53-dependent cell death pathway*. Cell Death Differ, 2008. **15**(11): p. 1782-93.
  215. Sabatini, D.M., *mTOR and cancer: insights into a complex relationship*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(9): p. 729-34.
  216. Vivanco, I. and C.L. Sawyers, *The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 489-501.
  217. Caumont, A.S., et al., *Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D*. J Biol Chem, 1998. **273**(3): p. 1373-9.

218. Kuai, J., et al., *Effects of activated ADP-ribosylation factors on Golgi morphology require neither activation of phospholipase D1 nor recruitment of coatomer*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 4022-32.
219. Yang, J.S., et al., *A role for phosphatidic acid in COPI vesicle fission yields insights into Golgi maintenance*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(10): p. 1146-53.
220. Cho, J.H., et al., *The TSP motif in AP180 inhibits phospholipase D1 activity resulting in increased efficacy of anticancer drug via its direct binding to carboxyl terminal of phospholipase D1*. Cancer Lett, 2011. **302**(2): p. 144-54.
221. Lee, C.S., et al., *The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(5): p. 477-84.
222. D'après Berridge, M.J.C.S.B.d.c., Cell Signalling Biology, 2012.
223. Bosetti, F., *Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models*. J Neurochem, 2007. **102**(3): p. 577-86.
224. Sang, N., et al., *Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor*. J Neurosci, 2005. **25**(43): p. 9858-70.
225. Vidensky, S., et al., *Neuronal overexpression of COX-2 results in dominant production of PGE2 and altered fever response*. Neuromolecular Med, 2003. **3**(1): p. 15-28.
226. Ghayor, C., A. Rey, and J. Caverzasio, *Prostaglandin-dependent activation of ERK mediates cell proliferation induced by transforming growth factor  $\beta$  in mouse osteoblastic cells*. Bone, 2005. **36**(1): p. 93-100.
227. Lambeau, G. and M. Lazdunski, *Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2*. Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(4): p. 162-70.
228. Park, J.Y., M.H. Pillinger, and S.B. Abramson, *Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases*. Clin Immunol, 2006. **119**(3): p. 229-40.
229. Forstermann, U. and B. Neufang, *Elimination from the circulation of cats of 6-keto-prostaglandin E1 compared with prostaglandins E2 and I2*. J Pharm Pharmacol, 1983. **35**(11): p. 724-8.
230. Tai, H.H., et al., *Prostaglandin catabolizing enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. **69**: p. 483-93.
231. Backlund, M.G., et al., *15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer*. J Biol Chem, 2005. **280**(5): p. 3217-23.
232. Hirsch, F.R. and S.M. Lippman, *Advances in the biology of lung cancer chemoprevention*. J Clin Oncol, 2005. **23**(14): p. 3186-97.
233. Tseng-Rogenski, S., et al., *Loss of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression contributes to bladder cancer progression*. Am J Pathol, 2010. **176**(3): p. 1462-8.
234. Eruslanov, E., et al., *Altered expression of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase in tumor-infiltrated CD11b myeloid cells: a mechanism for immune evasion in cancer*. J Immunol, 2009. **182**(12): p. 7548-57.
235. Yan, M., et al., *15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase inactivation as a mechanism of resistance to celecoxib chemoprevention of colon tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(23): p. 9409-13.
236. Judson, B.L., et al., *UV radiation inhibits 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase levels in human skin: evidence of transcriptional suppression*. Cancer Prev Res, 2010. **3**(9): p. 1104-11.
237. Brecht, K., et al., *Macrophages programmed by apoptotic cells promote angiogenesis via prostaglandin E2*. Faseb J, 2011. **25**(7): p. 2408-17.



238. Clasadonte, J., et al., *Gliotransmission by prostaglandin e(2): a prerequisite for GnRH neuronal function?* Front Endocrinol, 2011. **2**(91).
239. Bilson, H.A., D.L. Mitchell, and B. Ashby, *Human prostaglandin EP3 receptor isoforms show different agonist-induced internalization patterns.* FEBS Lett, 2004. **572**(1-3): p. 271-5.
240. Hasegawa, H., et al., *Different membrane targeting of prostaglandin EP3 receptor isoforms dependent on their carboxy-terminal tail structures.* FEBS Lett, 2000. **473**(1): p. 76-80.
241. Coleman, R.A., W.L. Smith, and S. Narumiya, *International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes.* Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 205-29.
242. Irie, A., et al., *The C-terminus of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype is essential for activation of GTP-binding protein.* Eur J Biochem, 1994. **224**(1): p. 161-6.
243. Sugimoto, Y., et al., *Two isoforms of the EP3 receptor with different carboxyl-terminal domains. Identical ligand binding properties and different coupling properties with Gi proteins.* J Biol Chem, 1993. **268**(4): p. 2712-8.
244. Narumiya, S., Y. Sugimoto, and F. Ushikubi, *Prostanoid receptors: structures, properties, and functions.* Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1193-226.
245. Sugimoto, Y., et al., *Distinct cellular localization of mRNAs for three subtypes of prostaglandin E receptor in kidney.* Am J Physiol, 1994. **266**(5 Pt 2): p. F823-8.
246. Breyer, M.D., et al., *In situ hybridization and localization of mRNA for the rabbit prostaglandin EP3 receptor.* Kidney Int, 1993. **44**(6): p. 1372-8.
247. Breyer, M.D., et al., *Differential localization of prostaglandin E receptor subtypes in human kidney.* Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 2): p. F912-8.
248. Honda, A., et al., *Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP2 subtype.* J Biol Chem, 1993. **268**(11): p. 7759-62.
249. Regan, J.W., et al., *Cloning of a novel human prostaglandin receptor with characteristics of the pharmacologically defined EP2 subtype.* Mol Pharmacol, 1994. **46**(2): p. 213-20.
250. Fujino, H., S. Salvi, and J.W. Regan, *Differential regulation of phosphorylation of the cAMP response element-binding protein after activation of EP2 and EP4 prostanoid receptors by prostaglandin E2.* Mol Pharmacol, 2005. **68**(1): p. 251-9.
251. Nishigaki, N., M. Negishi, and A. Ichikawa, *Two Gs-coupled prostaglandin E receptor subtypes, EP2 and EP4, differ in desensitization and sensitivity to the metabolic inactivation of the agonist.* Mol Pharmacol, 1996. **50**(4): p. 1031-7.
252. Li, X., et al., *Knockout of the murine prostaglandin EP2 receptor impairs osteoclastogenesis in vitro.* Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 2054-61.
253. Ono, K., et al., *The effect of deletion of cyclooxygenase-2, prostaglandin receptor EP2, or EP4 in bone marrow cells on osteoclasts induced by mouse mammary cancer cell lines.* Bone, 2003. **33**(5): p. 798-804.
254. Sugimoto, Y., et al., *Cloning and expression of a cDNA for mouse prostaglandin E receptor EP3 subtype.* J Biol Chem, 1992. **267**(10): p. 6463-6.
255. Hata, A.N. and R.M. Breyer, *Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation.* Pharmacol Ther, 2004. **103**(2): p. 147-66.
256. Katoh, H., et al., *Characterization of the signal transduction of prostaglandin E receptor EP1 subtype in cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells.* Biochim Biophys Acta, 1995. **11**(1): p. 41-8.

257. Suzawa, T., et al., *The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs*. Endocrinology, 2000. **141**(4): p. 1554-9.
258. Li, M., D.D. Thompson, and V.M. Paralkar, *Prostaglandin E(2) receptors in bone formation*. Int Orthop, 2007. **31**(6): p. 767-72.
259. Oka, H., et al., *Prostaglandin E2 inhibits mineralization and enhances matrix metalloproteinase-13 in mature cementoblasts mainly via the EP4 pathway*. Arch Oral Biol, 2008. **53**(3): p. 243-9.
260. Choudhary, S., et al., *Effect of deletion of the prostaglandin EP2 receptor on the anabolic response to prostaglandin E2 and a selective EP2 receptor agonist*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2008. **86**(1-4): p. 35-40.
261. Ninomiya, T., et al., *Prostaglandin E(2) receptor EP(4)-selective agonist (ONO-4819) increases bone formation by modulating mesenchymal cell differentiation*. Eur J Pharmacol, 2011. **650**(1): p. 396-402.
262. Rego, E.B., et al., *Ultrasound stimulation induces PGE(2) synthesis promoting cementoblastic differentiation through EP2/EP4 receptor pathway*. Ultrasound Med Biol, 2010. **36**(6): p. 907-15.
263. Tsujisawa, T., H. Inoue, and T. Nishihara, *SC-19220, antagonist of prostaglandin E2 receptor EP1, inhibits osteoclastogenesis by RANKL*. J Bone Miner Res, 2005. **20**(1): p. 15-22.
264. Zhang, M., et al., *EP1(-/-) mice have enhanced osteoblast differentiation and accelerated fracture repair*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(4): p. 792-802.
265. Camargo, P.M., et al., *Prostaglandins E(2) and F(2alpha) enhance differentiation of cementoblastic cells*. J Periodontol, 2005. **76**(2): p. 303-9.
266. Ahn, B.H., et al., *Up-regulation of cyclooxygenase-2 by cobalt chloride-induced hypoxia is mediated by phospholipase D isozymes in human astrogloma cells*. Biochim Biophys Acta, 2007. **12**(31): p. 15.
267. Scott, S.A., et al., *Design of isoform-selective phospholipase D inhibitors that modulate cancer cell invasiveness*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(2): p. 108-17.
268. Balcerzak, M., S. Pikula, and R. Buchet, *Phosphorylation-dependent phospholipase D activity of matrix vesicles*. FEBS Lett, 2006. **580**(24): p. 5676-80.
269. Coelho, M.J. and M.H. Fernandes, *Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation*. Biomaterials, 2000. **21**(11): p. 1095-102.
270. Born, A.K., et al., *Correlating cell architecture with osteogenesis: first steps towards live single cell monitoring*. Eur Cell Mater, 2009. **18**: p. 49-60.
271. Leroux-Berger, M., et al., *Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin*. Journal of Bone and Mineral Research, 2011. **26**(7): p. 1543-1553.
272. Giachelli, C.M., *The emerging role of phosphate in vascular calcification*. Kidney Int, 2009. **75**(9): p. 890-7.
273. Ciceri, P., et al., *Combined effects of ascorbic acid and phosphate on rat VSMC osteoblastic differentiation*. Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(1): p. 122-7.
274. Leroux-Berger, M., et al., *Pathologic calcification of adult vascular smooth muscle cells differs on their crest or mesodermal embryonic origin*. J Bone Miner Res, 2011. **26**(7): p. 1543-53.
275. O'Luanaigh, N., et al., *Continual production of phosphatidic acid by phospholipase D is essential for antigen-stimulated membrane ruffling in cultured mast cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(10): p. 3730-46.
276. Kusner, D.J., et al., *Evolutionary conservation of physical and functional interactions between phospholipase D and actin*. Arch Biochem Biophys, 2003. **412**(2): p. 231-41.



277. Farquhar, M.J., et al., *Interaction of PLD1b with actin in antigen-stimulated mast cells*. Cell Signal, 2007. **19**(2): p. 349-58.
278. Davies, M.R., R.J. Lund, and K.A. Hruska, *BMP-7 is an efficacious treatment of vascular calcification in a murine model of atherosclerosis and chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(6): p. 1559-67.
279. Six, I. and Z.A. Massy, *[Inflammation and vascular calcifications]*. Nephrol Ther, 2010. **6**(1): p. 70006-7.
280. Sethu, S., P.N. Pushparaj, and A.J. Melendez, *Phospholipase D1 mediates TNFalpha-induced inflammation in a murine model of TNFalpha-induced peritonitis*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. 0010506.
281. Parmentier, J.H., Z. Pavicevic, and K.U. Malik, *ANG II stimulates phospholipase D through PKCzeta activation in VSMC: implications in adhesion, spreading, and hypertrophy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(1): p. 19.
282. Raisz, L.G., C.C. Pilbeam, and P.M. Fall, *Prostaglandins: mechanisms of action and regulation of production in bone*. Osteoporos Int, 1993. **1**: p. 136-40.
283. Bergmann, P. and A. Schoutens, *Prostaglandins and bone*. Bone. 1995 Apr; **16**(4):485-8.
284. Jee, W.S., et al., *The effects of prostaglandin E2 in growing rats: increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation*. Calcif Tissue Int, 1985. **37**(2): p. 148-57.
285. Jee, W.S., et al., *The role of bone cells in increasing metaphyseal hard tissue in rapidly growing rats treated with prostaglandin E2*. Bone, 1987. **8**(3): p. 171-8.
286. Mori, S., et al., *Effects of prostaglandin E2 on production of new cancellous bone in the axial skeleton of ovariectomized rats*. Bone, 1990. **11**(2): p. 103-13.
287. Saponitzky, I. and M. Weinreb, *Differential effects of systemic prostaglandin E2 on bone mass in rat long bones and calvariae*. J Endocrinol, 1998. **156**(1): p. 51-7.
288. Sato, T., et al., *Molecular mechanisms of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced superoxide generation and degranulation in mouse neutrophils: phospholipase D is dispensable*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(1): p. 136-45.

# ANNEXE

## **Article 1: Analyse en acides gras des vésicules matricielles et des microvillosités extraites des chondrocytes d'embryons de poulets :**

Dans le cartilage et l'os, la calcification de la matrice se fait par l'intermédiaire des vésicules matricielles qui sont émises par l'ostéoblaste ou le chondrocyte hypertrophié dans la matrice cartilagineuse et contenant de fortes concentrations de phosphatase alcaline et de minéraux. Dans ces vésicules, l'initiation de la minéralisation se fait grâce à une accumulation de calcium et d'hydroxyde de phosphate qui précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite. Ce processus nécessite un système de régulation précis pour permettre de maintenir une homéostasie des ions calcium et du phosphate inorganique. Durant le phénomène de minéralisation, Wu et al en 2001 ont montré une augmentation en acide gras libre résultant d'une dégradation des phospholipides dû à une activation de phospholipases présentes dans les vésicules. Notre équipe a optimisé le mode de purification des vésicules matricielles, effectué la première analyse comparative protéomique et lipidique des vésicules matricielles et des membranes apicales. Les VMs et les microvillosités produites par les chondrocytes hypertrophiques et les ostéoblastes sont enrichies en cholestérol, phosphatidylsérine, sphingomyéline..

Mon objectif a été d'analyser la composition lipidique en acides gras des VMs issues des chondrocytes hypertrophiés d'embryons de poulet et de comparer ces structures aux microvillosités qui sont les précurseurs des vésicules matricielles et de la membrane plasmique. Nous avons purifié et caractérisé les VMs, les microvillosités à partir des extrémités des fémurs d'embryons de poulet datés de 17.5 jours. Nous avons ensuite obtenu les acides gras par transméthylation de l'extrait lipidique total et nous avons analysé en chromatographie en phase gazeuse chaque fraction membranaire (VMs, Microvillosités et chondrocytes).

## **Fatty acid composition in matrix vesicles and in microvilli from femurs of chicken embryos revealed selective recruitment of fatty acids.**

Dina Abdallah<sup>1,2</sup>, Eva Hamade<sup>2</sup>, Raghida Abou Merhi<sup>3</sup>, Badran Bassam<sup>2</sup>,  
René Buchet<sup>1</sup> and Saida Mebarek<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, Lyon, F-69361, France Université Lyon 1, Villeurbanne, F-69622,  
France INSA-Lyon, Villeurbanne, F-69622, France CPE Lyon, Villeurbanne, F-69616,  
France ICBMS CNRS UMR 5246, Villeurbanne, F-69622, France

<sup>2</sup> Genomic and Health laboratory/PRASE-EDST Campus Rafic Hariri-Hadath-Beirut-Liban,  
Faculty of Sciences, Lebanese university, Beirut 999095, Lebanon

<sup>3</sup> Department of Biochemistry, Laboratory of Immunology, EDST-PRASE, Lebanese  
University, Faculty of Sciences, Hadath-Beirut, Lebanon

### **Corresponding author**

Dr Saida Mebarek

Université Lyon 1, ICMBS UMR CNRS5246

Batiment Raulin

43 Boulevard du 11 Novembre 1918

69622 Villeurbanne Cedex France

Email: [saida.youjil@univ-lyon1.fr](mailto:saida.youjil@univ-lyon1.fr)

### **ABSTRACT**

Hypertrophic chondrocytes participate in matrix mineralization by releasing Matrix Vesicles (MVs). These MVs, by accumulating  $\text{Ca}^{2+}$  and phosphate initiate the formation of hydroxyapatite. To determine the types of lipids essential for mineralization, we analyzed Fatty Acids (FAs) in MVs, microvilli and in membrane fractions of chondrocytes isolated from femurs of chicken embryos. The FA composition in the MVs was almost identical to that in microvilli, indicating that the MVs originated from microvilli. These fractions contained more monounsaturated FAs especially oleic acid than in membrane homogenates of chondrocytes. They were enriched in 5, 8, 11-eicosatrienoic acid ( $20:3n-9$ ), in eicosadienoic acid ( $20:2n-6$ ), in arachidonic acid ( $20:4n-6$ ). In contrast, membrane homogenates from chondrocytes were enriched in  $20:1n-9$ ,  $18:3n-3$ ,  $22:5n-3$  and  $22:5n-6$ . Due to their relatively high content in MVs and to their selective recruitment within microvilli from where MV

originate, we concluded that 20:2n-6 and 20:3n-9 (pooled values), 18:1n-9 and 20:4n-6 are essential for the biogenesis of MVs and for bone mineralization.

**Key words** Matrix Vesicles, microvilli, chondrocytes, Fatty acids, mineralization.

## Abbreviations

MVs, Matrix Vesicles, PUFAs, PolyUnsaturated Fatty Acids, FAs, Fatty Acids, TNAP, Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase.

## 1. INTRODUCTION

MVs, Matrix Vesicles, PUFAs, PolyUnsaturated Fatty Acids, FAs, Fatty Acids, TNAP, Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase. Experimental evidence suggests that lipids are involved in the skeletal development and in bone formation. For example, phospholipids facilitate cartilage mineralization in growth plate [1]. Findings from animal models indicated that a low dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and increasing intake of n-3 PUFAs, especially long chain n-3 PUFAs, are beneficial for achieving higher bone mineral content, density and stronger bones [2,3]. Bone is a multifunctional organ that consists of a structural framework of mineralized matrix harboring a heterogeneous population of chondrocytes, osteoblasts, osteocytes, osteoclasts, endothelial cells, monocytes, macrophages, lymphocytes, and hematopoietic cells [4]. Mineralization competent cells, *e.g.*, osteoblasts and hypertrophic chondrocytes, which are present respectively in bones and in cartilages, release vesicular structures serving as an initial site for mineral formation. These vesicles called matrix vesicles (MVs) are derived from cellular plasma membrane [5]. Lipids are integral components of MV membrane and provide a barrier to confine the contents of the vesicles. Once released into the extracellular matrix, these MVs accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  and inorganic phosphate which finally leads to hydroxyapatite formation on the surface of the inner leaflet of the MV membrane. This process requires a dynamic and tightly regulated system to maintain ion homeostasis and cooperation between extracellular macromolecules and MV proteins [6, 7]. The cell surface microvilli are the precursors of MVs. A retraction of supporting microfilament network under the plasma membrane is essential for the release of MVs from osteoblast [8] and chondrocyte [9]. The mechanism of MV biogenesis is not fully understood. The nature of fatty acids (FAs) is a key factor for the MV formation. The ability and degree of FAs to modulate the membrane organization are dependent of their sizes and morphologies. Peress et al., 1974 [10] first reported the lipid composition of the MV fraction

isolated from epiphyseal cartilage of fetal calves. The phospholipid composition of the MV and microvilli fractions was markedly different from that of the chondrocytes. These MVs and microvilli produced by epiphyseal cartilage cells [10, 11] or by hypertrophic chondrocytes were enriched in cholesterol, phosphatidylserine, and sphingomyelin as in the case of MVs obtained from Saos-2 cell cultures [8]. However, the nature of FAs which are essential in the MV biogenesis was not determined. In this work we determined and compared the FA composition of MVs, microvilli and chondrocytes isolated from femurs of chicken embryos. The lipids were extracted and analyzed for their FA composition by thin-layer and gas-liquid chromatography.

## **2. MATERIALS and METHODS**

### **2.1 Isolation of MVs and microvilli fractions:**

MVs and microvilli were isolated from 17-day-old chicken embryos leg bones as reported [12]. The microvilli were prepared according to Jimenez et al. [13] with slight modifications (Fig. 1). The microvilli isolation was based on the property of  $\text{MgCl}_2$  to precipitate membranous fractions except microvilli [14]. It was suggested that aggregation of membranous components occurs when bivalent cations establish cross-links between membranes. Microvilli do not aggregate because cross-linking by  $\text{Mg}^{2+}$  is established between contiguous anionic sites on the same microvillus. Leg bones from 40 animals *per* preparation (approximately 12 g of wet tissue) were cut into 1–3 mm thick slices and extensively washed in the ice cold synthetic cartilage lymph (SCL) medium [15] containing 1.83 mM  $\text{NaHCO}_2$ , 12.7 mM KCl, 0.57 mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM NaCl, 0.57 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 5.55 mM glucose, 63.5 mM sucrose, and 16.5 mM 2-([2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]amino)-propanesulfonic acid (TES), pH 7.4. Bone slices were then digested with type-I collagenase from the *C. histoliticum* (Sigma; 200 U of collagenase/g of tissue) at 37°C for 180 min in SCL medium. The digested tissue was filtered through a nylon membrane. Then, cells were pelleted by centrifugation at 600g for 15 min. At this stage, supernatant 1 and pellet 1 were subjected separately to further treatment as described (Fig. 1). Supernatant 1 was centrifuged at 20,000g for 20 min to sediment all the cell debris, nuclei mitochondria and lysosomes (pellet 2) (Fig. 1). Pellet 2 was discarded while supernatant 2 was centrifuged again at 80,000g for 60 min yielding pellet 3 containing MVs (Fig. 1). Cells (pellet 1) were homogenized in 5 ml of sucrose buffer in the presence of protease inhibitor cocktail (Sigma). The homogenate was separated into two parts. The first part was kept for the extraction of membrane homogenates from chondrocytes. The second part was then centrifuged twice at

10,000g for 15 min to sediment intact cells, cell debris, nuclei, mitochondria, and lysosomes. To separate the microvillar membranes from the basolateral plasma membranes, the supernatant A (Fig. 1) was supplemented with 12 mM MgCl<sub>2</sub>, stirred at 4°C for 20 min to induce basolateral membrane precipitation. It was centrifuged twice at 2,500g for 10 min to pellet aggregates of basolateral membranes (pellet B) (Fig. 1). Supernatant B was centrifuged at 12,000g for 60 min to pellet microvilli (pellet C) (Fig. 1). Protein concentration in these fractions was determined using Bradford Protein Assay.

## 2.2 Tissue non-specific alkaline phosphatase activity assay

Tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) activity was measured using *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) as substrate at pH 10.4 and recording the absorbance at 405 nm, using  $\epsilon_{pNPP} = 18.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [16]. Enzyme units are micromole of *p*-nitrophenolate formed per minute per milligram of protein.

## 2.3 Lipid analyses

Total lipids were extracted from membrane fractions (pellet 3 for MVs, homogenate for membrane homogenates from chondrocytes and pellet C for microvilli) (Fig. 1) according to a modification of the method of Bligh and Dyer [17]. One ml of each sample was mixed with 3.75 ml methanol/chloroform (2/1, v/v) in presence of 50  $\mu\text{mol/L}$  of Butylhydroxytoluene, vigorously shaken for 1 min, incubated at room temperature for 30 min. Chloroform (1.25 ml) and water (1.25 ml) were subsequently added to the supernatant. The phase separation was performed by centrifugation at 2000g for 10 min. The lower organic phase containing the extracted lipids was collected and dried under a stream of N<sub>2</sub>. Total lipids were re-dissolved in chloroform and either analyzed by thin layer chromatography with the solvent system hexane/diethyl ether/acetic acid (70:30:1, by volume). The silica gel areas corresponding to phospholipids were scraped off and transmethylated for 90 min at 100°C in 250  $\mu\text{l}$  of toluene methanol (40:60) and 250  $\mu\text{l}$  of BF<sub>3</sub> 10% in methanol. The reaction was stopped in ice by adding 1.5 ml of 10% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v), and FA methyl esters were extracted with 2 ml of isooctane. The derivatives were analyzed by gas chromatography (GC) using an Agilent Technologies chromatograph (model 6890) fitted with a SolGel 1 ms dimethylpolysiloxane capillary column (60 mm by 0.2 mm [inner diameter], 0.25- $\mu\text{m}$  film thickness; SGE Europe, Ltd., France). The oven temperature was set at 80 °C for 1.5 min and increased to 150 °C at 20 °C min<sup>-1</sup> and then to 250 °C at 2 °C min<sup>-1</sup>. The temperature was maintained at 250 °C for 10 min before returning to the initial conditions. Helium was used as the carrier gas at 1 ml

min<sup>-1</sup>. The temperatures of the split/split-less injector and the flame ionization detector were set at 230 and 280°C respectively. The peaks were identified using standard FA methyl esters.

## **2.4 Statistical analysis**

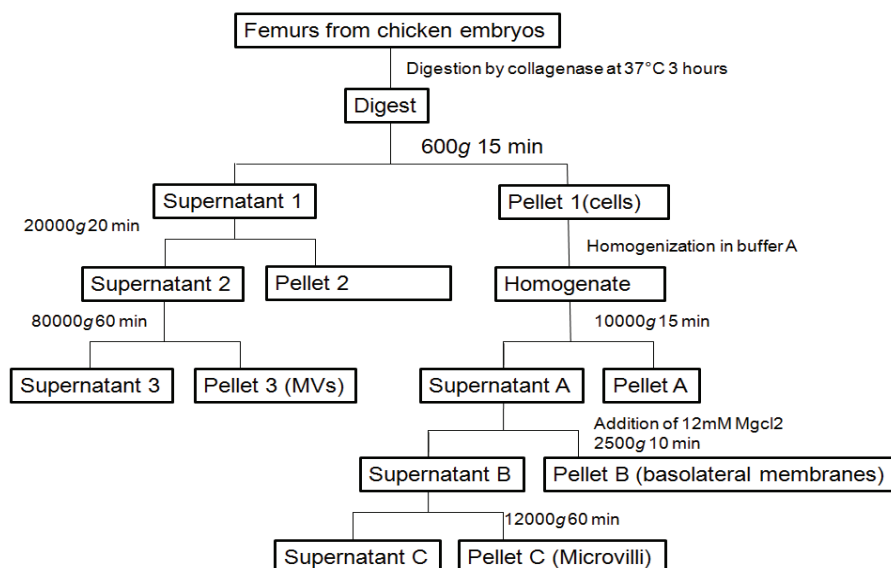
Data are presented as mean  $\pm$  standard error (SE). For statistical comparison, the t-test was employed using SigmaSTAT 3 software. P-values under 0.05 were considered to be statistically significant. Three to seven independent measurements (3 x 40 animals to 7 x 40 animals) were performed.

## **3. RESULTS**

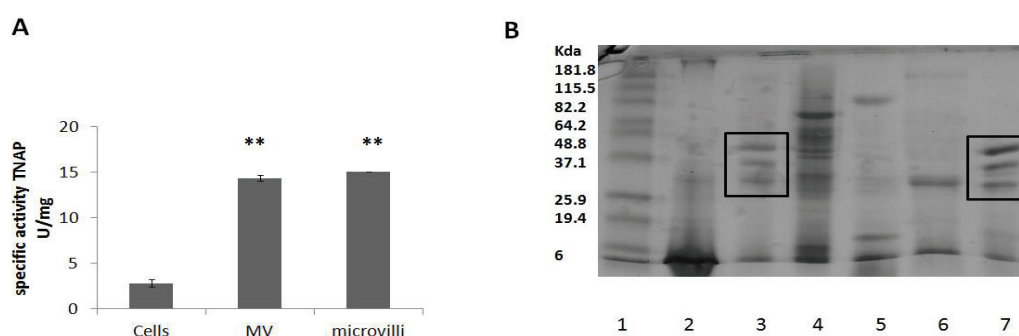
### **3.1 Characterization of matrix vesicles and microvilli**

Apical microvilli were isolated from chondrocytes according to the method of Jimenez et al. [13] used to obtain microvilli from human placental syncytiotrophoblast. It consisted of the Mg<sup>2+</sup>-induced precipitation in which non-microvillar membranes were aggregated and could be separated from vesicular microvilli by a low-speed centrifugation (Fig. 1). TNAP is a well known and widely used apical marker of polarized cells [13, 14, 18]. TNAP activity reached  $14.35 \pm 0.33$  U.mg<sup>-1</sup> and  $15.05 \pm 0.3$  U.mg<sup>-1</sup> for MV and microvillar fractions respectively, whereas the enrichment value of this enzyme was only  $2.83 \pm 0.44$  U.mg<sup>-1</sup> in membrane homogenates from chondrocytes (Fig.2 A). The distribution of MV proteins closely resembled to that of microvillar proteins but was different from that of membrane homogenates from chondrocyte (Fig. 2B). MV and microvillar protein profiles exhibited similar major bands with apparent molecular weights of: 45 kDa, 37 kDa, and 31 kDa. Taken together, these findings indicated that the isolated MVs and microvilli were relatively pure as compared with previous findings [8, 12, 19].





**Figure 1:** Schematic overview of the isolation of the matrix vesicles, microvilli and membrane homogenates from chondrocytes.



**Figure 2:** Characteristics of matrix vesicles, microvilli and membrane homogenates from chondrocytes. **A)** Specific TNAP activity in MVs, microvilli and membrane homogenates from chondrocytes. **B)** Gel electrophoresis of MVs, microvilli on 10% SDS–PAGE, stained with Coomassie brilliant blue. *Lane 1*, protein standards; *lane 2*, 20 µg of supernatant 3; *lane 3*, 20 µg of MV protein, pellet 3; *lane 4*, 20 µg of pellet 1 corresponding to membrane homogenates from chondrocytes; *lane 5*, 20 µg of supernatant C, *lane 6* ; 20 µg of basolateral membrane, and *lane 7*, 20 µg of Microvilli protein, pellet C.

### 3.2 Fatty acid composition in matrix vesicles, microvilli and membrane homogenates from chondrocytes.

FA compositions of MVs and microvilli were similar to each other but were distinctive from those of homogenate membranes. When the relative molar composition (mol in %) was considered, the total saturated and monounsaturated FAs in MVs, microvilli and membrane

homogenates from chondrocytes amounted to more than 80 % while the total n-6 PUFAs were less than 20 % , which is consistent with values found in MVs and chondrocytes from tibiotarsal growth cartilage of chick bones [19]. The low level of n-6 PUFAs may be related to the involvement of n-6 PUFAs in prostaglandin biosynthesis in growth cartilage. The predominant saturated FAs in different fractions were palmitic and stearic acid (16:0, 18:0) (Table 1). Membrane homogenates contained 62% of saturated FAs on average as compared with 48-51% of saturated FAs in MVs and microvilli. The greatest difference in FA content in different fractions was observed in the monounsaturated FAs. The monounsaturated FAs, specifically oleic acid (18:1n-9), were higher in the microvilli (18.71 %) and in the MVs (27.25 %) than of membrane homogenates from chondrocytes (6.48 %) (Table 1). We observed that the ratio of n-3 to n-6 FAs in chondrocyte membranes (0.30) was significantly higher than in matrix (0.06) and microvilli (0.05) membranes. The percentages of 20:4 n-6 in the MVs (5.61) and in the microvilli (8.08) were significantly higher than that of membrane homogenates (0.12) (Table 1). Since 20:2n-6 and 20:3n-9, 5,8,11-eicosatrienoic acid (Mead acid, 20:3n-9) co eluted [19], we report the combined value. The pooled contents of 20:2n-6 and 20:3n-9 in MVs (2.011) and in microvilli (1.36) were enriched as compared to that of membrane homogenates (0.74) (Table 1). Membrane homogenates from chondrocytes were enriched in 20:1n-9, 18:3n-3, 22:5n-3 and 22:5n-6 as compared to MVs and microvilli.

FA	MV	Microvilli	Cells
14:00	0,47 ± 0,17	0,4±0,2	0,54±0,2
16:00	35,34±1,09	34,44±2,1	42,19±4,09
18:00	13,06±0,56	13,84±0,33	19,06±2,27
22:00	0,225±0,09	0,73±0,38	0,42±0,05
24 00	0,2475±0,14	0,49±0,26	0,44±0,34
16:1n-9	2,88±1,1	3,63±1,16	1,43±1,34
16:1n-7	2,56±1,19	8,08±3,96	3,65±1,77
18:1n-9	27,25±1,15**	18,71±0,59##	6,48±3
18:1n-7	0,82±0,69	1,84±1,022	2,14±1,07
18:2n-6	7,58±0,75	7,95±0,98	10,67±3,38
18:3n-6	0,06±0,02	0,037±0,028	0,07±0,02
18:3n-3	0,008±0,005***	0,0078±0,007#	0,08±0,025
20:1n-9	0,12±0,052	0,029±0,017#	0,22±0,06
20:2n-6 and 20 :3n-9	2,011±0,32*	1,36±0,15	0,74±0,38
20:3n-6	1,87±1,05	0,19±0,11	0,65±0,22
20:4n-6	5,61±1,26*	8,08±1,22#	0,12±0,12
20:5n-3	0,12±0,06*	0#	0,54±0,18
22:4n-6	0,51±0,2	0,64±0,36	0,07±0,055
22:5n-6	0,26±0,07*	0,093±0,05##	0,58±0,032
22:5n-3	0,42±0,21	0,058±0,029	0,97±0,975
22:6n-3	0,79±0,37	0,88±0,59	2,25±1,3
SATURATED	48±1,29	51±1,45	62,5±6,24
MONOUNSATURATED	33,4±1,6	32,3±3,4	13,9±5,6
PUFA	19±1,87	19,4±2,57	22±1,09
n-3 PUFA	1,07±0,24	0,94±0,56	4,84±0,4
n-6 PUFA	17,6±1,76	18,36±2,24	16,25±0,7
n-3/n-6 Ratio	0,06	0,05	0,30

FA contents were expressed in mol% and the values represent the mean ± SE from three to seven independent determinations (n).

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$  MV (n=7) vs.chondrocytes (n=3)

# $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  microvilli (n=3) vs chondrocytes (n=3)

#### 4. Discussion

It was earlier recognized that FA profiles varied with age of chicks [19, 20]. Significant changes of 16:0, 18:0, 18:1n-9 and 20:4n-6 in chick femurs were observed during aging [20] suggesting that these FAs are involved in bone formation [20]. Our aim was to determine the origin of the enriched FA fractions in MVs and which FAs are essential for the mineralization. We examined and compared FA compositions in MVs and in microvilli extracted from 17-day-old chick embryos, where the FA profile changes are expected to be well correlated with bone growth [19, 20]. Several enriched FAs in MVs, especially 18:1n-9 and 20:4n-6 were also found to be enriched in microvilli, in contrast to homogenate membranes where they were less abundant. This suggests that the microvilli incorporated specific FAs for regulating membrane structure, dynamics and permeability, before MVs budding. FA composition in MVs was reminiscent of that of microvilli indicating that the

enriched fractions of 18:1n-9 and 20:4n-6 in microvilli were essential to MVs biogenesis. Oleic acid (18:1n-9), represents approximately 20-30% of the total FA content in the MVs and the microvilli. These fractions have higher percentages of 20:4n-6, 20:2n-6 and 20:3n-9 as compared with those in membrane homogenates. This is consistent with higher level of 20:3n-9 levels in human fetal cartilage ( $2.0 \pm 0.6\%$  of total FAs) than that in fetal muscle ( $0.2 \pm 0.2\%$ ), liver ( $0.4 \pm 0.2\%$ ) and spleen ( $0.1 \pm 0.2\%$ ) [22, 23]. 20:3n-9 is endogenously synthesized from oleic acid (18:1n-9) [24] which is also enriched in MVs. It was earlier recognized that n-6 eicosanoids may regulate chondrocytes differentiation *in vitro* [25]. MVs possess an activated phospholipid metabolism that is regulated independently from that of the cell [26, 27]. MV PKC is stimulated by arachidonic acid. In addition, we propose that the enriched fractions of 18:1n-9, 20:4n-6, 20:2n-6 and 20:3n-9 accumulated in microvilli are essential precursors for the biogenesis of MVs since they were also found in MVs where they accounted for the most part of FA composition. Due to their relatively high content in MVs and to their selective recruitment within microvilli from where MVs originate 18:1n-9, 20:4n-6, 20:2n-6 and 20:3n-9 are essential to maintain and to form MVs in leg bones from chicken embryos.

### **Conclusions :**

Dans cet article, nous avons montré que la composition en acides gras des VMs est très similaire à celle des microvillosités mais différente de celle des chondrocytes. En effet, les VMs et les microvillosités sont enrichies en acide oléique (18:1 n-9), en acide arachidonique (20:4 n-6)-ainsi qu'en acide éicosadiénoïque (20:2 n-6) et 5,8,11 acide éicosatriénoïque (20:3 n-9). Ceci suggère que les microvillosités recruteraient des acides gras spécifiques qui seraient nécessaire pour réguler la structure, la dynamique et la perméabilité de la membrane, favorisant ainsi la formation des VMs.

### **Acknowledgements**

We would like to thank Pr. M. Guichardant for the fatty acid analyses performed using the facilities of the Lipidomic Platform of the Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides (Lyon, France). We acknowledge Dr. Brizuela Madrid for the English correction.

## References:

- [1] R.E. Wuthier, Involvement of cellular metabolism of calcium and phosphate in calcification of avian growth plate cartilage, *J Nutr* 123 (1993) 301-309.
- [2] B.Y. Lau, D.J. Cohen, W.E. Ward, D.W. Ma, Investigating the role of polyunsaturated FAs in bone development using animal models, *Molecules* 18 (2013) 14203-14227.
- [3] S. Mebarek, A. Abousalham, D. Magne, I.D. Do, J. Bandorowicz-Pikula, S. Pikula, R. Buchet, Phospholipases of mineralization competent cells and MVs: roles in physiological and pathological mineralizations, *Int J Mol Sci* 14 (2013) 5036-5129.
- [4] B.A. Watkins, Y. Li, H.E. Lippman, M.F. Seifert, Omega-3 polyunsaturated FAs and skeletal health, *Exp Biol Med (Maywood)* 226 (2001) 485-497.
- [5] E.E. Golub, Biomineralization and MVs in biology and pathology, *Semin Immunopathol* 33 (2011) 409-417.
- [6] M. Balcerzak, A. Malinowska, C. Thouverey, A. Sekrecka, M. Dadlez, R. Buchet, S. Pikula, Proteome analysis of MVs isolated from femurs of chicken embryo, *Proteomics* 8 (2008) 192-205.
- [7] C. Thouverey, A. Malinowska, M. Balcerzak, A. Strzelecka-Kiliszek, R. Buchet, M. Dadlez, S. Pikula, Proteomic characterization of biogenesis and functions of MVs released from mineralizing human osteoblast-like cells, *J Proteomics* 74 (2011) 1123-1134.
- [8] C. Thouverey, A. Strzelecka-Kiliszek, M. Balcerzak, R. Buchet, S. Pikula, MVs originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells, *J Cell Biochem* 106 (2009) 127-138.
- [9] J.E. Hale, R.E. Wuthier, The mechanism of MV formation. Studies on the composition of chondrocyte microvilli and on the effects of microfilament-perturbing agents on cellular vesiculation, *J Biol Chem* 262 (1987) 1916-1925.
- [10] N.S. Peress, H.C. Anderson, S.W. Sajdera, The lipids of MVs from bovine fetal epiphyseal cartilage, *Calcif Tissue Res* 14 (1974) 275-281.
- [11] R.E. Wuthier, Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and MVs, *Biochim Biophys Acta* 409 (1975) 128-143.
- [12] R. Buchet, S. Pikula, D. Magne, S. Mebarek, Isolation and characteristics of matrix vesicles, *Methods Mol Biol* 1053 (2013) 115-124.
- [13] V. Jimenez, M. Henriquez, P. Llanos, G. Riquelme, Isolation and purification of human placental plasma membranes from normal and pre-eclamptic pregnancies. a comparative study, *Placenta* 25 (2004) 422-437.

- [14] A.G. Booth, A.J. Kenny, A rapid method for the preparation of microvilli from rabbit kidney, *Biochem J* 142 (1974) 575-581.
- [15] L.N. Wu, T. Yoshimori, B.R. Genge, G.R. Sauer, T. Kirsch, Y. Ishikawa, R.E. Wuthier, Characterization of the nucleational core complex responsible for mineral induction by growth plate cartilage matrix vesicles, *J Biol Chem* 268 (1993) 25084-25094.
- [16] G.W. Cyboron, R.E. Wuthier, Purification and initial characterization of intrinsic membrane-bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage, *J Biol Chem* 256 (1981) 7262-7268.
- [17] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification., *Can J Biochem Physiol* 37 (1959) 911-917.
- [18] F. Moog, R.D. Grey, Spatial and temporal differentiation of alkaline phosphatase on the intestinal villi of the mouse, *J Cell Biol* 32 (1967) C1-5.
- [19] H. Xu, B.A. Watkins, H.D. Adkisson, Dietary lipids modify the FA composition of cartilage, isolated chondrocytes and MVs, *Lipids* 29 (1994) 619-625.
- [20] B. Dołęgowska, Z. Machoy, D. Chlubek, Profiles of fatty acids in different bone structures of growing chicks, *Vet Res Commun* 30 (2006) 735-747.
- [21] J.E. Hale, R.E. Wuthier, The mechanism of matrix vesicle formation. Studies on the composition of chondrocyte microvilli and on the effects of microfilament-perturbing agents on cellular vesiculation, *J Biol Chem* 262 (1987) 1916-1925.
- [22] K.A. Cleland, M.J. James, M.A. Neumann, R.A. Gibson, L.G. Cleland, Differences in fatty acid composition of immature and mature articular cartilage in humans and sheep, *Lipids* 30 (1995) 949-953.
- [23] H.D. Adkisson, F.S. Risener, P.P. Zarrinkar, M.D. Walla, W.W. Christie, R.E. Wuthier, Unique fatty acid composition of normal cartilage: discovery of high levels of n-9 eicosatrienoic acid and low levels of n-6 polyunsaturated fatty acids, *FASEB J* 5 (1991) 344-353.
- [24] I. Ichi, N. Kono, Y. Arita, S. Haga, K. Arisawa, M. Yamano, M. Nagase, Y. Fujiwara, H. Arai, Identification of genes and pathways involved in the synthesis of Mead acid (20:3n-9), an indicator of essential FA deficiency, *Biochim Biophys Acta* 1841 (2014) 204-213.
- [25] M.L. Kemick, J.E. Chin, R.E. Wuthier, Role of prostaglandins in differentiation of growth plate chondrocytes, *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 19 (1989) 423-426.

- [26] Z. Schwartz, D.L. Schlader, L.D. Swain, B.D. Boyan, Direct effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 24,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on growth zone and resting zone chondrocyte membrane alkaline phosphatase and phospholipase-A<sub>2</sub> specific activities, *Endocrinology* 123 (1988) 2878-2884.
- [27] Z. Schwartz, H. Ehland, V.L. Sylvia, D. Larsson, R.R. Hardin, V. Bingham, D. Lopez, D.D. Dean, B.D. Boyan, 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) and 24R,25-dihydroxyvitamin D(3) modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase, *Endocrinology* 143 (2002) 2775-2786.



## Article 2 :

### **Proliferation and differentiation of human adipose derived . mesenchymal stem cells(ASCs) into osteoblastic lineage is passage dependent**

Jiovanni A. Di Battista<sup>1</sup>, Wassim Shebaby<sup>2</sup>, Ozge Kizilay<sup>1</sup>, Eva Hamade<sup>3</sup>, Raghida Abou Merhi<sup>4</sup>, Saida Mebarek<sup>5</sup>, Dina Abdallah<sup>6</sup>, Bassam Badran<sup>7</sup>, Fady Saad<sup>8</sup>, Eddie Abdalla<sup>9</sup> and Wissam H. Faour<sup>10\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Rheumatology, Royal Victoria Hospital, McGill University Health Center, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>2</sup>Department of Natural Sciences, School of Arts and Sciences, Lebanese American University, Byblos, Lebanon Division of Experimental Medicine, Department of Medicine, McGill University, Montreal (Qc) Canada.

<sup>3</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences I, Lebanese University, Hadath, Lebanon.

<sup>4</sup>Genomique et Sante, Lebanese University, Hadath, Lebanon.

<sup>5</sup>Universite de Lyon, Lyon, F-69361, France; Universite Lyon 1, Villeurbanne, F-69622, France; INSA-Lyon, Villeurbanne, F-69622, France; CPE Lyon, Villeurbanne, F-69616, France; ICBMS CNRS UMR 5246, Villeurbanne, F-69622, France.

<sup>6</sup>Institut de Chimie et Biochimie Moleculaires et Supramoleculaires, ICBMS UMR 5246 - Universite Lyon <sup>1</sup>. Plateforme de recherche et d'analyse en Sciences de l'environnement , Universite Libanaise, Liban.

<sup>7</sup>Department of Biochemistry, Laboratory of Immunology, EDST-PRASE, Lebanese University, Faculty of Sciences, Hadath-Beirut, Lebanon.

<sup>8</sup>Fadi Saad, Hopital Saint-Louis, Jounieh, Lebanon.

<sup>9</sup>Department of Surgery, University Medical Center-Rizk Hospital, Beirut, Lebanon.

<sup>10</sup>School of Medicine, Lebanese American University, Byblos, Lebanon.

\* send correspondence to: Dr. Wissam H. Faour

Instructor in Pharmacology/Medicine

Gilbert and Rose-Marie Chagoury School of medicine

Lebanese American University

Byblos, Lebanon

P.O. Box 36

Tel: 961-9-547262

Fax: 961-9-944200



Email: [wissam.faour@lau.edu.lb](mailto:wissam.faour@lau.edu.lb)

Running title: Osteogenesis of human adipose derived stem cells.

Keywords: stem cells, osteogenesis, growth kinetics, adipose tissues, differentiation.

## ABSTRACT

Human fat is an important source of mesenchymal stem cells. Stem cell therapy requires significant amount of stem cells obtained only through in vitro expansion, but its effect on their stemness properties is controversial. Flow cytometric analysis revealed that ASCs at Passage 2 express classical mesenchymal stem cell markers including CD44, CD73, and CD105, but they are CD14, CD19, CD34, CD45, and HLA-DR negative. Calcium deposition (a marker of osteogenesis) which was the highest at P2 steadily declined throughout passages and is completely abrogated at P4. Cells at P2 showed significant increase in alkaline phosphatase activity compared to control non-treated cells. Growth kinetic curves showed significant reduction in cell division of mesenchymal cells throughout passages. Growth curves of cells at Passage 2 (P2) exhibited exponential phases, while cells at Passage 4 and Passage 6 (P6) showed near linear growth curves with an increase in cell population doubling time from 3.2 at P2 to 4.8 at P6. Cells in various subcultivation stages showed flattened shape at low density and spindle like structures in near confluent flasks. Our data demonstrate that osteogenic potential of ASCs is impaired by successive cultivation with cut-off point of 2 passages to use for ASCs in culture.

## INTRODUCTION

Many organs in the body including bone marrow [1,2], cord blood [3], placenta [4], umbilical cord [4], skeletal muscles [5] and skin [6] harbor a small fraction of undifferentiated progenitor and mesenchymal stem cells. These undifferentiated cells act as a reservoir for tissue repair and can differentiate into specific lineage upon proper biochemical or physiologic stimulation. Adipose tissue is derived from the mesodermal germ layer, similar to bone marrow, and contains a supportive stroma that can be easily isolated [7]. This stromal fraction of adipose tissue contains heterogeneous population of cells, including endothelial cells, smooth muscle cells, pericytes, fibroblasts, mast cells and pre-adipocytes [8,9]. In addition of being considered as the largest endocrine organ that secrete multiple bioactive factors called adipokines involved in cardiovascular physiology [10,11], adipose tissue is a source of regenerative stem cells of mesenchymal origin [12,13] capable of differentiating into multiple lineages including osteoblast [14,15], chondrocytes [16,17], cardiomyocytes [18],

myocytes [19], endothelial cells [20,21] and neuron like cells [22]. Stem cells characterized from adipose tissue are invariably named multipotent adipose tissue derived-mesenchymal cells or ASCs. ASCs were subjected to extensive investigation due to their self-renewal properties and potential to restore damaged tissues with reduced self-regenerative properties such as bone and cartilage [23-25]. Since the body contains easy-to-reach and relatively large fat stores, isolation of stem cells from fat sources attracted many researchers. Using self-fat derived stem cells for autologous stem cell transplantation will prevent rejection or cumbersome pharmacotherapy associated with allogeneic transplantation. Regardless the fact that ASCs can be isolated from fat of patients from various age groups or gender, the effect of age, body-mass index and gender might affect the quality of isolated stem cells. Interestingly, Zaim et al. claimed that donor age and long-term culture of bone marrow derived stem cells can impair the stem cell ability to differentiate into other mesenchymal lineages [26]. However conflicting results were documented about the effect of age on the differentiation potential of ASCs. Whilst de Girolamo et al found that age had a negative impact on the ability of ASCs to differentiate into osteoblasts [27] Shi et al showed that the osteogenic potential of ASCs is maintained through age [28]. Moreover, cell concentration was influenced by the donor site and types of fat isolated from a single donor [29]. Most of the fat-derived stem cells are serially cultured and subcultivated before their induction with proper differentiating agents. This particular protocol has been used to increase the yield of isolated stem cells in vitro and interestingly demonstrated limited risk of tumourigenicity [30]. It has been found that sustained culturing might affect growth ability and showed significant changes in the stemness genes of ASCs after passage 10 [30-32], but little is known in this regard. This issue is of particular interest since using stem cells with low stem potential can be associated with limited therapeutic outcomes. Altogether these results suggest that extensive subcultivation might negatively impact ASCs osteogenic properties which can be translated into reduced bone healing properties. This study is undertaken to understand the effect of successive subcultivation on the in vitro behavior of ASCs and their ability to differentiate into osteoblastic lineage. Our data showed that the reduction in ASCs ability to differentiate into osteoblasts correlate with the number of cell culture passages which was almost lost at passage four. Oppositely to previously reported results, cut-off point of 2 successive passages is the threshold beyond which ASCs start to lose their osteogenic potential.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Human subject:**

Adipose tissue was resected from patients undergoing hip, other types of surgery in addition to osteoarthritic [33] knee cartilage specimens obtained from patients undergoing total joint replacement surgery who were diagnosed based on the criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA/RA (mean age  $67 \pm 19$ ) [34,35]. McGill University Ethics Review Board and local ethics committees at the Jewish General Hospital and Royal Victoria Hospital (Montreal, Quebec, Canada) approved the use of specimens obtained surgically. Procedures done in Lebanon were approved by the Committee on Human Subject in Research (CHSR) of the Lebanese American University. Next of kin provided informed consent for samples obtained from patients (aged 40-78 years old) and were asked to read the consent forms and approve/sign them prior to surgery.

### **Mesenchymal cells isolation:**

Fat samples were processed within 4 hours after isolation from the patient. Extra non-fat tissues were surgically removed in a sterile environment. A total of 3g piece of fat is cut and washed twice with sterile PBS (1X) (Sigma). Fat pieces were incubated in 1% Pen/Strep PBS (1X) for 1 hour and then washed twice with PBS (1X). Fat tissues were then minced and incubated with 0.005 % type I collagenase (Sigma) + PBS (1X) (10 times more volume of the adipose tissue), for 5gr tissue we add 50ml PBS (1X) + 0.25 gr type I collagenase. Adipose tissue/collagenase suspension is incubated at 37 degree Celsius and gently mixed every 15 min for 1-2h until most of the fat tissue is digested then Fetal Bovine Serum (Sigma) at a proportion of 1/20ml is added to inhibit collagenase activity. The suspension is then centrifuged at 4 degree, 2000 rpm for 5 minutes. Adipocytes and remaining non digested fat tissue that appeared as a yellow oily layer at the top of the tube were removed and pellet is resuspended in complete growth media containing RMPI + 10% FBS + 1% P/S. Cells were seeded in 75cm<sup>2</sup> culture plates (1gr adipose tissue in 75 cm<sup>2</sup> flask) and kept for 48 hours to allow adherence of hMSC. After 48 hours non-adherent cells were washed and new complete fresh growth media was added to the plate. Media is changed every 2 days until they become near confluent where they were detached with 0.25% trypsin containing 1mMEDTA for 4 min at 37°C.

**Mesenchymal stem cell (MSC) labeling by flow cytometry:**

Adipose tissue (5 g) was treated with 2 mg/mL of collagenase in DMEM, 10 % FBS, and antibiotics for 4-6 h after which time the cells were pelleted, washed, and cell viability determined by trypan blue exclusion. Fifty thousand cells were then placed into T-75 flasks for culture, split 1 to 3 at confluence and the cells were analyzed for MSC markers at passage 2. After antibody staining ( $1 \times 10^5$  cells) for 30 min at 4°C in labeling buffer, the cells were washed and analyzed by flow cytometry using FACS Calibur (Becton Dickinson) and FlowJo version 6.3.4 software. The following fluorochrome-conjugated antibodies (Abs) were used for surface staining: FITC-conjugated anti-CD45, CD90, (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canada), PE-conjugated anti-CD73, PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD105, and APC-conjugated anti-CD-34, CD19, and HLA DR (Bio Legend, San Diego, CA). The appropriately labeled isotype control antibodies were used for each cell surface marker.

**Cell culture and induction of mineralization:**

Freshly isolated adipose-derived stem cells (ASCs) were cultured in RPMI supplemented with 1% P/S (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin (all from Sigma), and 15% fetal bovine serum (FBS, v/v, Sigma). The mineralization was induced by culturing the confluent cells (7 days to reach confluence) in growth medium supplemented with 50 mg/ml ascorbic acid (AA; Sigma) and 7.5 mM  $\beta$ -glycerophosphate ( $\beta$ -GP; Sigma). Drugs were added to the media in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma). Control cultures received an equivalent amount of the solvent (0.05%, v/v) [36].

**Alkaline phosphatase assay:**

Tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) activity was measured according to the manufacturer protocols using p-nitrophenyl phosphate as substrate at pH 10.4 and recording the absorbance at 420 nm (ep-NP is equal to 18.8/mM/ cm) [36]. Enzyme units are micromole of p-nitrophenolate released per minute per milligram of protein.

**Calcium assay:**

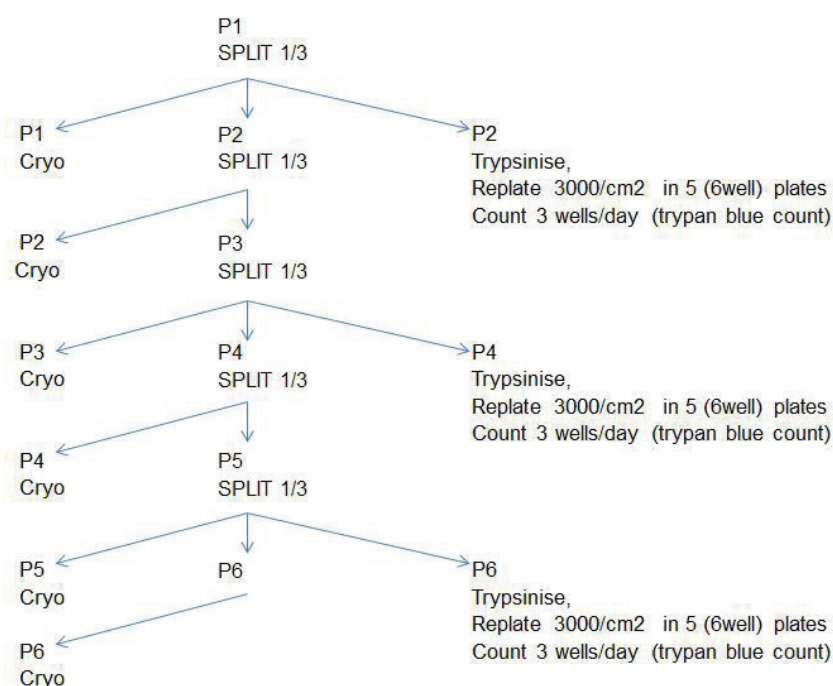
Cell cultures were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with 0.5% (w/v) Alizarin Red-S (AR-S) in PBS (pH 5.0) for 30 min at room temperature. After washing four times with PBS to remove free calcium ions, the stained cultures were photographed. Then, cell cultures were destained with 10% (w/v) cetylpyridinium chloride in PBS pH 7.0 for 60

min at room temperature. AR-S concentration was determined by measuring the absorbance at 562 nm [36].

### **Growth kinetic protocol:**

To measure growth kinetics of serially passaged cultures, primary ASCs cultivated in 75 cm<sup>2</sup> flasks were trypsinized, manually counted on a hemacytometer with trypan blue exclusion method and cells stained with trypan were excluded from the count. Each trypsinized flask of primary cells is equally subcultivated into additional three 75 cm<sup>2</sup> flasks rendering cells at passage 1. Flasks containing cells at passage 1 are trypsinized at near confluency and the cells are replated at a density of  $3 \times 10^3$  cells per cm<sup>2</sup> in 6 wells plates to make a total of 30 wells and therefore contain cells at passage 2. Cells were then kept overnight to adhere and were maintained for ten days with medium changes occurring every 2 days. Starting the day after plating (day 0) and continuing each day until day 9, three dishes were trypsinized to determine cell number and viability using trypan blue exclusion methods and cells stained blue with trypan were excluded from the count. The remaining T75 cm<sup>2</sup> flasks at passage 1 are subcultivated at a 1/3 proportion to prepare cells in T75 cm<sup>2</sup> flasks at passage 2. Then T75 cm<sup>2</sup> flasks at passage 2 are subcultivated at a 1/3 proportion to prepare cells in T75 cm<sup>2</sup> flasks at passage 3. Then Cells from passage 3 near confluent flasks are trypsinized and seeded into additional 6 well plates to make a total of 30 wells which therefore contain cells at passage 4. From the remaining set of passage 3 flasks, a number of flasks are subcultivated at a 1/3, and one of the near confluent flask is subsequently used for next set of passages in a similar manner to the previously described protocol. This scheme of serial subcultivation, with growth kinetics assays at each passage, was continued until passage 6. The remaining cells in the flasks and not used for both subcultivation and growth kinetic assay at all stages were trypsinized and cryopreserved. Details of the procedure are shown in (fig. 1).

Fig. 1

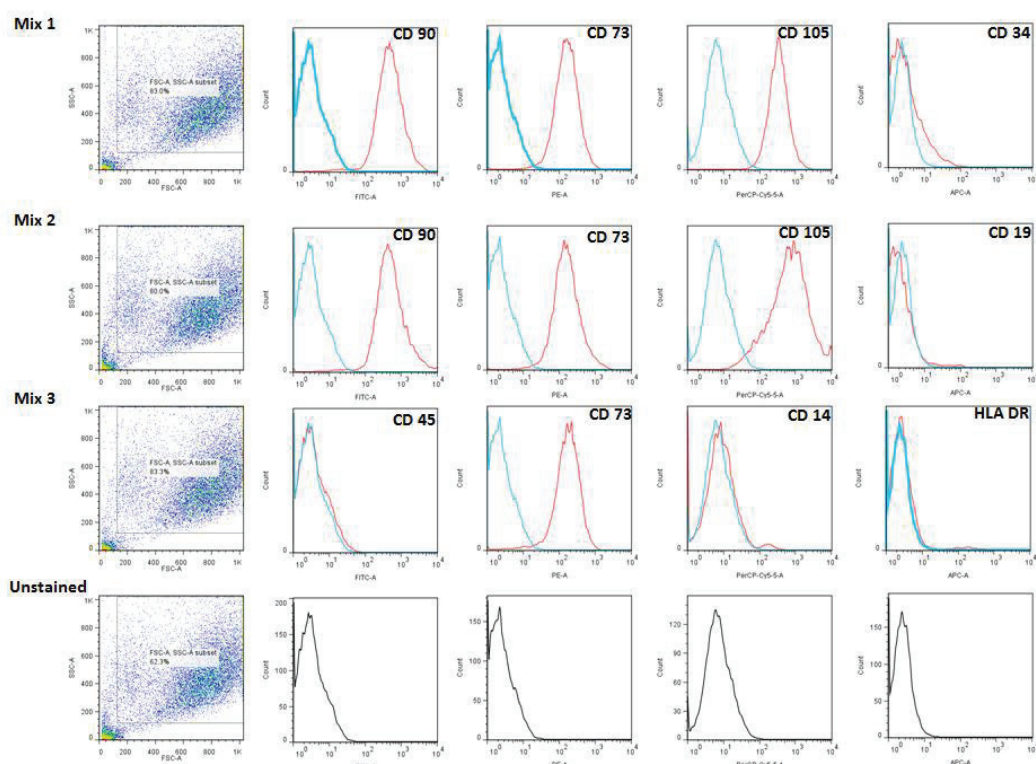


**Fig.1:** Protocol for serial subcultivation of ASCs.

### Doubling time:

Cell population doubling time of cultured ASCs at various passages was calculated using the following formula: Cell population doubling time =  $(t \times \ln 2) / (\ln N_2 - \ln N_1)$ ,  $t$  = number of hours in culture,  $N_1$  = number of cells at the beginning of culture,  $N_2$  = number of cells at the log phase. As shown in (Fig.2) the estimated number of days at which ASCs stop dividing was 6 for P2, 7 for P4 and 7 for P6. The corresponding doubling time at each passage is therefore 3.32 for P2, 6.8 for P4 and 4.87 for P6 [37].





**Fig.2:** Stem cell markers of ASCs. Flow cytometric analysis of ASCs at P2 using the following fluorochrome-conjugated antibodies raised against the following surface marker as described in material and methods: CD45, CD90, CD73, CD105, 34, CD19 and HLA DR.

### Light microscopy analysis:

Cells cultured at various time points and from different passages as indicated in the figures were photographed by light microscopy at 10X magnification.

### Statistics:

Unless otherwise stated, all numerical data are presented as means  $\pm$  standard error. Statistics analysis was performed using t-test (Sigma Stat from SPSS, Statistical Packages for the Social Sciences, Chicago, IL, USA). A p value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

### Results:

#### Expression of stem cell markers by mesenchymal cells isolated from human fat tissues:

Cells, at the P2 stage, stained for markers of s-cells, myelomonocytes, hematopoietic precursor, and MHC class II cell surface receptor (HLA-DR) showed no appreciable



fluorescence intensity when compared to isotype controls. In contrast, classical mesenchymal stem cell markers CD73, CD90, and CD105 were strongly labeled (Fig2).

### Osteogenic differentiation of serially subcultivated ASCs:

Figure 3 illustrates the osteogenic potential of various cells in primary cultures, P2, P4 and P6 subcultures as judged by calcium deposition and increased ALP activity. Osteogenesis is induced following incubation of near confluent cultures with  $\beta$ -glycerophosphate and ascorbic acid. Calcium deposits start to appear after day 6 reaching a maximum at day 12 in primary and P2 cultures. Alkaline phosphatase activity was similarly elevated in  $\beta$ -glycerophosphate treated cells compared to control non stimulated cells at day 12. Interestingly, subcultures at P4 and P6 showed no significant difference in calcium deposition compared to control non-treated ASCs with  $\beta$ -glycerophosphate. Finally, calcium deposition and increased ALP activity was the highest in primary cultures which begin to decline as cells are serially subcultured throughout P2 and marked with total loss of ALP activity and ability to deposit calcium once ASCs reached passage 4.

Fig3a

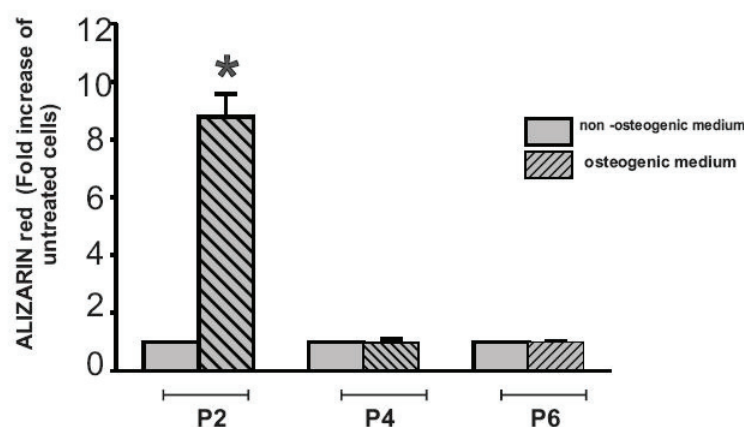


Fig3b

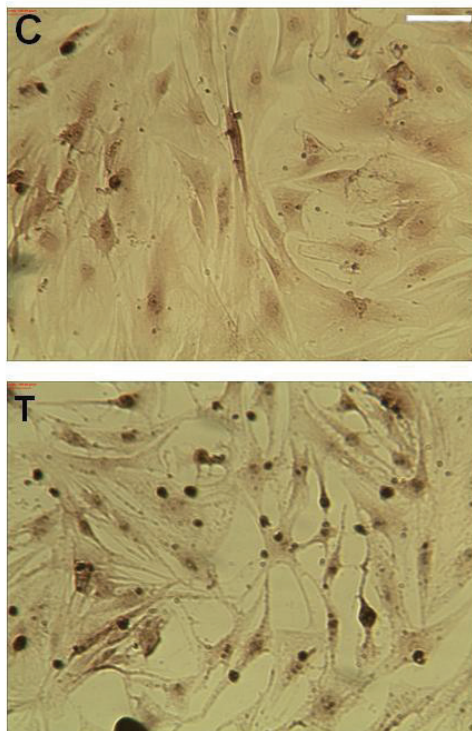
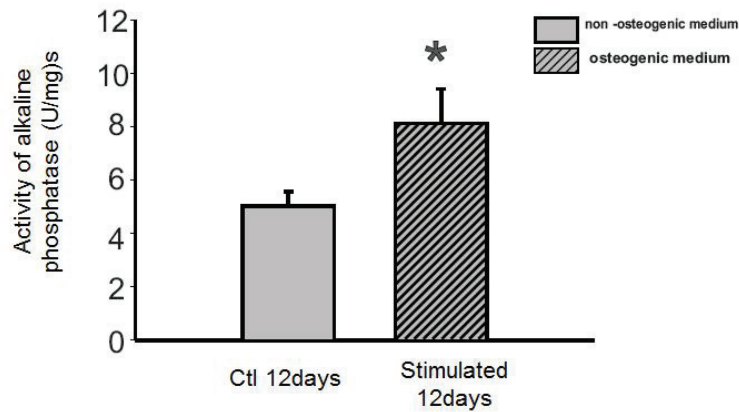
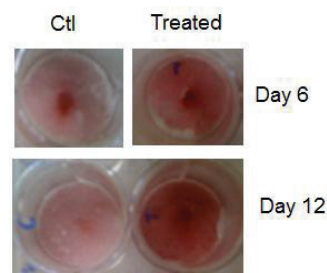


Fig3c

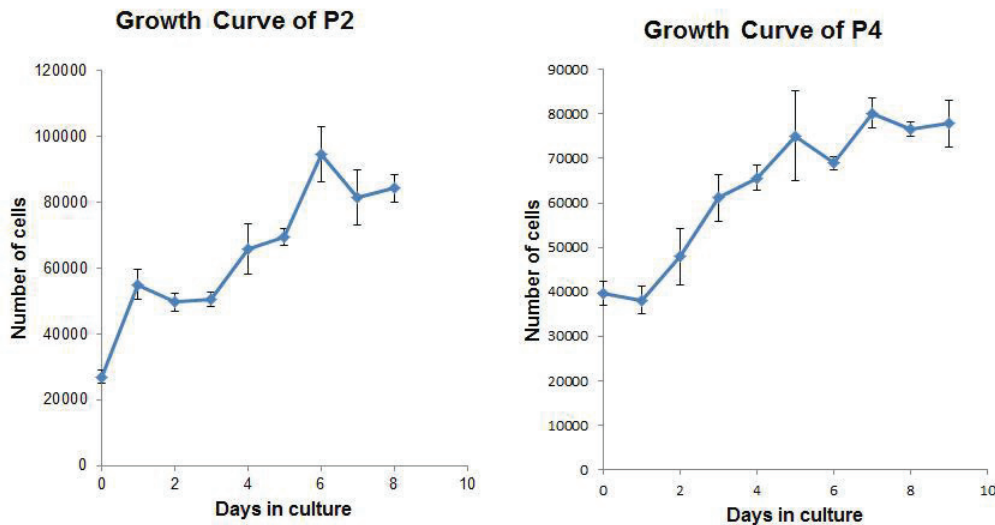


**Fig.3:** Osteogenic properties of cells at passage 2. Mesenchymal cells at P2 (A, B and C) were incubated either with full growth media ("C" upper figure) or with full growth media and 7.5mM  $\beta$ -glycerophosphate and 50 $\mu$ g/mL ascorbic acid ("T" lower figure) as indicated. Alkaline phosphatase and calcium deposition when applicable were determined according to the techniques described in the material and method sections (A and B). Calcium deposit in cells was shown at 10X light microscopy in mesenchymal cells, or in culture dishes. (n=4, \*P<0.05 as significant differences with respect to the control). Scale bar = 10 $\mu$ m (3C)

### **Growth properties of subcultivated adipose-derived stem cells:**

Figure 4 illustrates mesenchymal cells isolated from fat and distributed into 6-wells plates were counted over 10 days of culture. The period of 10 days of culture was chosen as cells start to proliferate the day after trypsin treatment and following adherence to the culture plate, considered day 0, and entered into proliferation arrest phase at day 6-7 depending in the passage number. Additional culture time for one to two days was needed for the cells to fully enter into the arrest phase. Finally a graph is plotted and showing the growth kinetic over 10 days period. The above procedure is repeated for cells at passage 2, passage 4 and passage 6. As shown in figure 4A, ASCs in passage 2 start dividing at day 0 and their number is almost doubled at day 2, this period is followed by lag/slow phase of proliferation until day 4 within which cell division and cell growth are significantly reduced. Then cells started to divide at day 4 until day 6 and entered a slow/arrest phase thereafter. The initial number of cells seeded at day 0 was approximately  $3 \times 10^3$  cells and reached a maximum of  $10 \times 10^5$  by day 6 but declined to a minimum of  $8 \times 10^4$  thereafter. Interestingly, cells at passage 4 showed slightly similar growth kinetic pattern compared to that obtained with cells in P2 but with much lower number of dividing cells. Moreover, growth kinetic curve from day 1 to day 5 showed near linear shape and cells entered a quiescent/growth arrest phase at day 7. Mesenchymal cells at P6 exhibited stringent linear growth curve normally obtained with cell lines (Fig 4B). ASCs start dividing at day 0 and continue growing reaching a steady state at day 7 with maximum number of cells neared  $8 \times 10^4$ . Interestingly, ASCs at P2 exhibited a higher proliferation rate with a doubling period of 3.2, while cells at P4 showed the lowest proliferation rate with a doubling time of 6.8, but the growth rate was increased after 2 additional passages and cells at P6 showed an increase in doubling reaching 4.87.

Fig4a



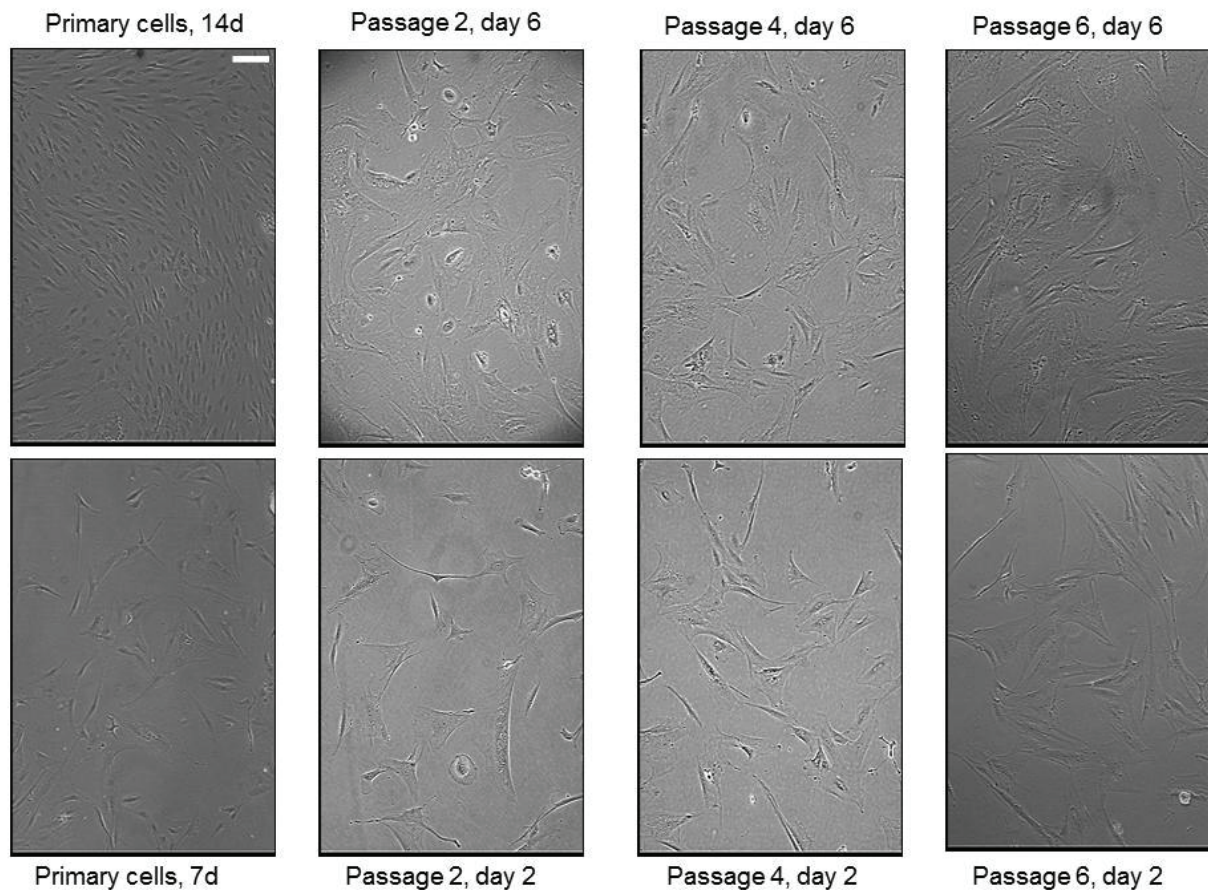
**Fig.4:** Growth kinetic results of ASCs at passage 2, 4 and 6. Adipose derived mesenchymal cells at passage 2 and Passage 4 (A) and passage 6 (B) were cultivated in 6 well-plates and cell number is determined with trypan blue exclusion count in triplicate. In (B), growth rate is compared between various passages at P2, P4 and P6. Error bars represent the standard deviation.

#### Cell morphology of subcultivated ASCs:

Isolated primary cell cultures exhibited various cell morphologies and included cells with variable shapes. As illustrated in fig 5, round, elongated and spindle like cells are present in the culture media and cells tend to grow in aggregates rather than spreading out in the flask. Cells started to acquire similar morphology as they started to grow in the culture media and showed a fibroblastic-like phenotype in near confluent flasks. Starting from P1, cultures are equally spread in the flask. This in particular is more likely due to trypsin dissociating effect which enabled uniform distribution of the cells in the culture flask. In P2, cells with various shape and size are found scattered over the plate bottom and slowly fill the flask bottom as they grow, this stage is characterized by significant reduction of fibroblastic-like or round shaped cells. In P4, cultured cells exhibited mostly pyramidal shape but with various size, and cells with pyramidal shape mainly persist in the cultures. In P6, cells exhibited more uniform irregular shape with similar size, their shape continue to change as they grow. This stage is characterized by the ability of the cells to dense in pack in highly confluent flask. In P2 and

P4, cells seeded at low density showed a flattened shape were cells are able to cover the vast majority of the flask, flattened shape start to change into fibroblastic-like shape once cells number start to increase in the cultures (Fig 5).

Fig5



**Fig.5:** Morphology of cells at various cultivation phases. Primary and subcultivated adipose mesenchymal cells are cultured until confluency as indicated. Morphologic appearance of cells was shown at 10X light microscopy in primary cells and mesenchymal cells at different passages. Cells were seeded at a density of 3000 cells/cm<sup>2</sup>, and morphology and appearance was followed until confluency and/or quiescence for a maximum of 10 days. Scale bar = 10µm.

## Discussion

Stem cell therapy represents promising tools to treat chronic illnesses. While multiple trials using stem cells showed promising results, more efforts are required before stem cells can be safely introduced into medical practice. Stem cell rejection, unknown long term clinical outcomes and side effects are major factors that limit achievements of stem cell therapy.



Moreover, therapy with stem cells requires invasive procedures to introduce sufficient number of stem cells into a damaged site of an organ [25]. Since their discoveries, many successful attempts have been made to isolate, culture and induce-to-differentiate stem cells into various lineages [12,18,38]. However, different biological outcomes have been described by researchers. Discrepancies among stem cells were described in the literature. While stem cells isolated from bone marrow can be effectively cryopreserved and subcultured without reduction in their stem cell potential [1], fat-derived stem cells were more sensitive and exhibit reduction in their stem cell potential following long term culture [39,32]. Moreover, the anatomical site of fat used to isolate stem cells had significant impact on the ability of ASCs to differentiate into various lineages including osteoblasts [29]. Additionally, the method used to remove fat e.g., aspiration or surgery, influenced the yield of isolated stem cells [40]. Although all fat sources can provide stem cells, the number of primary cells required for therapeutic intervention is relatively low, which requires further expansion in vitro. Here we show for the first time that ASCs behave differently from stem cells isolated from bone marrow. Accordingly, extensive subcultivation severely impaired both their potential to grow and to differentiate into osteoblasts. In turn, long term subcultivation showed that mesenchymal cells can acquire a novel fibroblastic phenotype evidenced by a drop of the cell population doubling time from 6.8 at P4 to 4.8 at P6 as well as linear growth rate obtained at P6 (Fig. 2C). The latter results suggest that long term subcultivation contribute to formation of more homogenous cell cultures behaving similarly to cell lines, but lacking at least osteogenic potential. The presence of stem cell markers in cells at P2 (Fig. 2) demonstrate indeed the presence of stem cell population within the primary isolated pool of cells. As such, the influence of serial subcultivation on the expression pattern of stem cell markers within the pool of stem cells requires further investigation. It is well documented that fat is an endocrine organ that release numerous hormones involved in body physiology called adipokines which might be important for sustained maintenance of healthy ASCs [41]. Alternatively, ASCs in vitro will lack the biological effect of adipokines which might explain reduced stem potential of cultured ASCs. Moreover, studies showed that fat of obese patients' exhibited reduced yield of stem cells. Similar results were found with increased BMI and age. All these data suggest that maintenance ASCs requires highly controlled physiologic environment which normally not provided in culture and can in part explain reduced stem potential of cultured ASCs. Our data, can explain in part the discrepancies obtained in attempts to inject stem cells into damaged organs. The effect of the in vitro environment tends to be a major determinant of stem cell therapy which should be taken into consideration.

Therefore successful clinical therapeutic outcomes using ASCs should take into account the number of in vitro passages of cells isolated from fat that should respect a cut-off of 2 successive passages in order to obtain significant yield of mesenchymal cell and still retaining stem properties.

### **Acknowledgment:**

WHF and JDB designed and coordinated the study. JDB, FS and EA provided the human fat tissues. WS, OK, EH, DA, SM, BB and RAM carried out the experiments. WF and JDB wrote and critically revised the manuscript. EH helped with the conception and design of the study, and with drafting the manuscript. All authors approved the final manuscript.

**Conflict of interest statement:** All authors declare that they have no competing interests.

John A. Di Battista is a professor of Medicine . Department of Pharmacology and Therapeutics at McGill University and recipient of a Canadian Institute of Health Research Grant (CIHR). Dr Wissam Faour is a recipient of a Lebanese National Council for Scientific Research (LNCSR) Grant and an Instructor in Pharmacology at the School of Medicine at the Lebanese American University. This work is supported by a grant from the Lebanese National Council for Scientific Research (LNCSR) and the Canadian Institute of Health research (CIHR).

### **References**

- 1-Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997 64:278-94.
- 2-Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI: Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992, 13:81-8.
- 3-Meyer TP, Hofmann B, Zaisserer J, Jacobs VR, Fuchs B, Rapp S, Weinauer F, Burkhardt J: Analysis and cryopreservation of hematopoietic stem and progenitor cells from umbilical cord blood. *Cytotherapy* 2006, 8:265-76.
- 4-Kadam S, Govindasamy V, Bhonde R: Generation of functional islets from human umbilical cord and placenta derived mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol* 2012, 879:291-313.



- 5-Zheng B, Chen CW, Li G, Thompson SD, Poddar M, Peault B, Huard J: Isolation of myogenic stem cells from cultures of cryopreserved human skeletal muscle. *Cell transplantation* 2012,21:1087-93.
- 6-Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD: Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 2001, 3:778-84.
- 7-Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM: Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology* 2001, 189:54-63.
- 8-Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA: Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* 2007, 100:1249-60.
- 9-Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM: Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006, 24:376-85.
- 10-Gollasch M: Vasodilator signals from perivascular adipose tissue. *Br J Pharmacol* 2012, 165:633-42.
- 11-Miao CY, Li ZY: The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol* 2012, 165:643-58.
- 12-Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001, 7:211-28.
- 13-Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the Cell* 2002, 13:4279-95.
- 14-Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P: (2003) Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 2003, 85:740-7.
- 15-Hicok KC, Du Laney TV, Zhou YS, Halvorsen YD, Hitt DC, Cooper LF, Gimble JM: Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng* 2004, 10:371-80.
- 16-Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F: Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *BiochemBiophys Res Commun* 2002, 290:763-9.

- 17-Awad HA, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F: Effects of transforming growth factor beta1 and dexamethasone on the growth and chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2003, 9:1301-12.
- 18-Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L: Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004, 94:223-9.
- 19-Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH: Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 2002, 109:199-209.
- 20-Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ: Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007, 25:2363-70.
- 21-Verseijden F, Jahr H, Posthumus-van Sluijs SJ, Ten Hagen TL, Hovius SE, Seynhaeve AL, van Neck JW, van Osch GJ, Hofer SO: Angiogenic capacity of human adipose-derived stromal cells during adipogenic differentiation: an in vitro study. *Tissue Eng Part A* 2009, 15:445-52.
- 22-Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galie M, Sbarbati A, Krampera M, Belluzzi O, Bonetti B: Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008, 17:909-16.
- 23-Dhinsa BS, Adesida AB: Current clinical therapies for cartilage repair, their limitation and the role of stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 2012, 7:143-8.
- 24-Ren ML, Peng W, Yang ZL, Sun XJ, Zhang SC, Wang ZG, Zhang B: Allogeneic adipose-derived stem cells with low immunogenicity constructing tissue-engineered bone for repairing bone defects in pigs. *Cell transplantation* 2012, 21:2711-21.
- 25-Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiari M, Kon E: Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013, 21:1717-29.
- 26-Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S: Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol* 2012, 91:1175-86.
- 27-de Girolamo L, Lopa S, Arrigoni E, Sartori MF, BaruffaldiPreis FW, Brini AT: Human adipose-derived stem cells isolated from young and elderly women: their differentiation potential and scaffold interaction during in vitro osteoblastic differentiation. *Cytherapy* 2009, 11:793-803.

- 28-Shi YY, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT: The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast ReconstrSurg* 2005, 116:1686-96.
- 29-Padoin AV, Braga-Silva J, Martins P, Rezende K, Rezende AR, Grechi B, Gehlen D, Machado DC: Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration. *Plast ReconstrSurg* 2008, 122:614-8.
- 30-Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH: The impact of long-term in vitro expansion on the senescence-associated markers of human adipose-derived stem cells. *Appl Biochem Biotechnol* 2012, 166:2101-13.
- 31-Wan Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH: The changes of stemness biomarkers expression in human adipose-derived stem cells during long-term manipulation. *Biotechnol Appl Biochem* 2011, 58:261-70.
- 32-Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH: Long-term in vitro expansion of human adipose-derived stem cells showed low risk of tumourigenicity. *J Tissue EngRegen* 2012, 2:1-11.
- 33-Gologan R, Dobrea C, Popa L, Gioada L, Dragomir M: Multiple myeloma in remission complicated by bone marrow granulomas. *Rom J Intern Med* 2003,41:323-8.
- 34-Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, Christy W, Cooke TD, Greenwald R, Hochberg M, et al: (1986) Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986, 29:1039-49.
- 35-Hochberg MC, Chang RW, Dwosh I, Lindsey S, Pincus T, Wolfe F: The American College of Rheumatology 1991 revised criteria for the classification of global functional status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1992, 35:498-502.
- 36-Thouverey C, Strzelecka-Kiliszek A, Balcerzak M, Buchet R, Pikula S: Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. *J Cell Biochem* 2009, 106:127-38.
- 37-Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Milligen FJ. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 2008, 332:415-426.
- 38-Jung S, Sen A, Rosenberg L, Behie LA: Human mesenchymal stem cell culture: rapid and efficient isolation and expansion in a defined serum-free medium. *J Tissue EngRegenMed* 2012, 6:391-403.

39-Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, Ritt MJ, van Milligen FJ: Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell and tissue research* 2008, 332:415-26.

40-Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ: Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 2006, 8:166-77.

41-Halvorsen YD, Wilkison WO, Briggs MR: (2000) Human adipocyte proteomics. a complementary way of looking at fat. *Pharmacogenomics* 2000, 1:179-85.

#### **List of abbreviations used in this paper:**

CD44: cluster of differentiation 44

CD73: ecto-5'-nucleotidase / cluster of differentiation 73

CD14: cluster of differentiation 14

CD105: endoglin

CD19: B-lymphocytes antigen CD19 / cluster of differentiation 19

CD34: cluster of differentiation 34

CD45: leukocyte common antigen

HLA DR: human leucocyte antigen DR

ASCs: human adipose derived mesenchymal stem cells

P2: passage 2

P4: passage 4

P6: passage 6

OA: osteoarthritis

RA: rheumatoid arthritis

CHSR: committee on human subject in research

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS: fetal bovine serum

P/S: penicillin / streptomycin

TNAP: Tissue non-specific alkaline phosphatase

AR-S: alizarin red . S

ALP: alkaline phosphatase

AA: ascorbic acid

β-GP: β-glycerophosphate